

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

# **ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE DO VALE DO ITAJAÍ EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado  
em Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Inês M.<sup>a</sup> Costa Brighente.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo

Mirele Tilton Calderari

FLORIANÓPOLIS - SC

2002

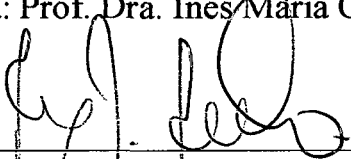
## TERMO DE APROVAÇÃO

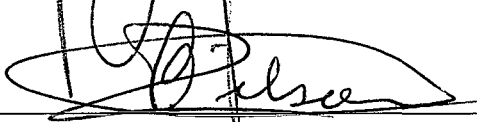
MIRELE TITTON CALDERARI

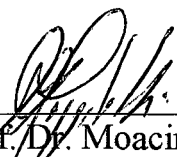
### ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE DO VALE DO ITAJAI EM SANTA CATARINA

Dissertação Aprovada como requisito parcial para conclusão do Mestrado em Química, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
Orientadora: Prof. Dra. Inês Maria Costa Brighente

  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo

  
Prof. Dr. Dilson Roque Zanette

  
Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

  
Prof. Dra. Tereza Cristina Rozane de Souza

Florianópolis, março de 2002

“A vida da humanidade está intimamente ligada à vida das plantas e dos animais, portanto, conhecer a natureza é conhecer o próprio ser humano”.

A autora

A Deus, Criador supremo da vida, na qual fundamentou-se esta obra e que sempre esteve presente em todos os momentos, dando-me força e determinação para persistir na execução deste trabalho.

Dedico.



## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por permitir a elaboração desta dissertação de mestrado e por nos disponibilizar a natureza, como a grande fonte deste estudo.
- A minha família, principalmente meus pais, Ricardo e Maria Joana e minhas irmãs Graziela e Ivone Maria pela confiança, persistência e prontidão em todos os momentos da minha vida.
- Aos doutores Inês e Ricardo, pela orientação, amizade e auxílio na realização desta dissertação.
- Aos professores e pesquisadores, em especial, ao professor Aluísio Marcondes, pelo auxílio no trabalho, na pesquisa em laboratório, nas análises instrumentais, a Marília Borgo na identificação taxonômica das espécies e a Professora Gladys Roseane Thomé Vieira, pela realização das análises microbiológicas.
- Aos colegas do laboratório e amigos de mestrado, em especial a Viviane, Rosemi, Eliane, Luiz Verdi e Márcia pelo companheirismo e pelos momentos alegres e difíceis ocorridos durante a execução de nossas pesquisas.
- A Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Regional de Blumenau e Universidade Federal do Paraná pelo amparo, pela infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho.
- A CAPES e FUNCITEC pela disponibilização de recursos financeiros que viabilizaram a realização do mestrado Interinstitucional.
- Aos meus alunos de graduação pela colaboração e apoio.
- A Madre Eva Michalak pelos seus conhecimentos, amizade e por permitir a utilização de espécies coletadas na Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas de Rodeio.
- Aos amigos, pela compreensão nas ausências ao longo destes anos, em especial a Cynthia e Luciana pelo grande incentivo.
- A todos mencionados e não mencionados, o meu sincero, muito obrigado!

## SUMÁRIO

|  |       |
|--|-------|
| ÍNDICE DE TABELAS .....  | ix    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | xii   |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....   | xv    |
| RESUMO.....  | xvii  |
| ABSTRACT .....   | xviii |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 1     |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 3     |
| 2.1 Histórico .....  | 3     |
| 2.2 Descrição Botânica e Características de Óleos Essenciais de Espécies do gênero <i>Piper</i> .... | 7     |
| 2.2.1 <i>Piper caldense</i> C. DC.....   | 9     |
| 2.2.2 <i>Piper callosum</i> .....  | 10    |
| 2.2.3 <i>Piper lindbergii</i> C. DC. in DC.....  | 11    |
| 2.2.4 <i>Piper regnellii</i> .....   | 12    |
| 2.2.4.1 <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallenscens</i> (C.DC.) Yuncker .....                         | 12    |
| 2.2.4.2 <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> .....                      | 13    |
| 2.2.5 <i>Piper mollicomum</i> Kunth.....   | 14    |
| 2.2.6 <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var. <i>gaudichaudianum</i> .....                          | 15    |
| 2.3 Óleos Essenciais.....  | 19    |
| 2.3.1 Biogênese e Classificação Química dos Óleos Essenciais .....                                   | 21    |
| 2.3.2 Bioatividade dos Óleos Essenciais .....  | 25    |
| 2.4 Métodos de Separação .....   | 30    |

|   |    |
|---|----|
| 2.5 Identificação de Óleos Essenciais .....                                   | 32 |
| 3 OBJETIVO .....  | 36 |
| 3.1 Geral .....   | 36 |
| 3.2 Específico .....  | 36 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 37 |
| 4.1 Reagentes e Solventes .....   | 37 |
| 4.2 Coleta e Classificação do Material Vegetal .....                          | 37 |
| 4.3 Métodos de Extração e Purificação .....                                   | 41 |
| 4.4 Métodos de Caracterização .....   | 43 |
| 4.4.1 Análise Física.....   | 43 |
| 4.4.2 Cromatografia a Gás – CG.....   | 43 |
| 4.4.3 Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa – CG/EM.....   | 44 |
| 4.4.4 Ressonância Nuclear Magnética.....                                      | 47 |
| 4.6 Análise Microbiológica .....  | 47 |
| 4.6.1 Teste de Difusão em Ágar.....   | 48 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 49 |
| 5.1 <i>Piper caldense</i> C. DC. ....   | 49 |
| 5.2 <i>Piper callosum</i> .....   | 50 |
| 5.3 <i>Piper lindbergii</i> C.DC. in DC. ....                                 | 57 |
| 5.4 <i>Piper regnellii</i> .....  | 60 |
| 5.4.1 <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallesces</i> (C.DC) Yuncker .....       | 61 |
| 5.4.2 <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> ..... | 68 |
| 5.5 <i>Piper mollicomum</i> Kunth .....                                       | 75 |
| 5.6 <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var. <i>gaudichaudianum</i> .....     | 84 |
| 5.7 Ensaios Microbiológicos .....   | 87 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 6 CONCLUSÃO .....                  | 89 |
| 7 PERSPECTIVAS .....               | 91 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 92 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 01.</b> Coletas realizadas com as diferentes espécies do gênero <i>Piper</i> .  | 40 |
| <b>Tabela 02.</b> Relação dos números de registro das espécies estudadas e seus respectivos herbários.                                    | 41 |
| <b>Tabela 03.</b> Lista dos padrões puros de óleos essenciais utilizados na identificação de componentes no CG-EM da UFPR.                | 44 |
| <b>Tabela 04.</b> Lista dos padrões puros de hidrocarbonetos utilizados na identificação de componentes no CG-EM da UFPR.                 | 45 |
| <b>Tabela 05.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper caldense</i> C.DC. após secagem a temperatura ambiente.                     | 50 |
| <b>Tabela 06.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper callosum</i> após secagem a temperatura ambiente.                           | 50 |
| <b>Tabela 07.</b> Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie <i>Piper callosum</i> .              | 51 |
| <b>Tabela 08.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 20/03/00).          | 52 |
| <b>Tabela 09.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 20/03/00).        | 53 |
| <b>Tabela 10.</b> Constituição química do óleo essencial folhas frescas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 12/12/00).            | 54 |
| <b>Tabela 11.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper lindbergii</i> C.DC. in DC. após secagem à temperatura ambiente.            | 57 |
| <b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie <i>Piper lindbergii</i> C.DC. in DC. | 58 |
| <b>Tabela 13.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie <i>Piper lindbergii</i> (coleta de 01/04/00).        | 58 |
| <b>Tabela 14.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper regnellii</i> após secagem à temperatura ambiente.                          | 60 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 15.</b> Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie <i>Piper regnellii</i> .   | 61 |
| <b>Tabela 16.</b> Constituição química das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (C.DC) Yuncker (coleta de 20/03/00).   | 62 |
| <b>Tabela 17.</b> Constituição química das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (C.DC) Yuncker (coleta de 12/12/00).   | 63 |
| <b>Tabela 18.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> (coleta de 07/06/00).  | 68 |
| <b>Tabela 19.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> (coleta de 19/08/00).  | 69 |
| <b>Tabela 20.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> (coleta de 31/01/01).  | 70 |
| <b>Tabela 21.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> (coleta de 28/06/00).  | 73 |
| <b>Tabela 22.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. in DC., var. <i>regnellii</i> (coleta de 28/06/00).  | 74 |
| <b>Tabela 23.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper mollicomum</i> Kunth após secagem a temperatura ambiente.   | 75 |
| <b>Tabela 24.</b> Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie <i>Piper mollicomum</i> Kunth, teste de fluorescência e revelação com iodo das placas de CCD e resultados de densidade e índice de refração dos óleos. | 76 |
| <b>Tabela 25.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 01/04/00).  | 77 |
| <b>Tabela 26.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 13/05/00) utilizando rampa de aquecimento 02, conforme tabela 25.   | 78 |
| <b>Tabela 27.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 06/06/00) utilizando rampa de aquecimento 02, conforme tabela 25.   | 78 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 28.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta 09/12/00). .....   | 79 |
| <b>Tabela 29.</b> Grau de desidratação das folhas da <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var. <i>gaudichaudianum</i> após secagem a temperatura ambiente. ....  | 84 |
| <b>Tabela 30.</b> Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var. <i>gaudichaudianum</i> . ....                                 | 85 |
| <b>Tabela 31.</b> Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth (coleta de 01/04/00). ....  | 85 |
| <b>Tabela 32.</b> Espécies e resultados obtidos dos ensaios microbiológicos realizados utilizando as cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .... | 87 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 01.</b> Taxa de exportação e importação Brasileira de Óleos Essenciais em toneladas de produto entre os anos de 1975 e 1990 (Fonte: IAPAR, 1995).....                  | 5  |
| <b>Figura 02.</b> Índices de exportação em peso das espécies <i>Mentha arvensis</i> , Sassafrás e Pau Rosa no período entre 1975 e 1990 (Fonte: IAPAR, 1995).....                | 5  |
| <b>Figura 03.</b> Fotografia da espécie <i>Piper caldense</i> C. DC. retirada no Parque Municipal São Francisco de Assis. ....   | 9  |
| <b>Figura 04.</b> Fotografia da espécie <i>Piper callosum</i> retirada na Congregação das Irmãs Franciscanas do município de Rodeio.....   | 10 |
| <b>Figura 05.</b> Fotografia da espécie <i>Piper lindbergii</i> C. DC. <i>in</i> DC. retirada no bairro Salto Weissbach, município de Blumenau. ....                             | 11 |
| <b>Figura 06.</b> Fotografia da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (C.DC.) Yuncker retirada na Congregação das Irmãs Franciscanas do município de Rodeio..... | 12 |
| <b>Figura 07.</b> Fotografia da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. DC. <i>in</i> DC., var. <i>regnellii</i> retirada no Campus I da FURB, município de Blumenau. ....      | 13 |
| <b>Figura 08.</b> Fotografia da espécie <i>Piper mollicomum</i> Kunth tirada no Parque Municipal São Francisco de Assis. ....  | 14 |
| <b>Figura 09.</b> Fotografia da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var. <i>gaudichaudianum</i> retirada no Parque Municipal São Francisco de Assis. ....                | 16 |
| <b>Figura 10.</b> Estruturas de alguns componentes de Óleos Essenciais.....  | 23 |
| <b>Figura 11.</b> Biossíntese de Terpenos (Fonte: SIMÕES <i>et al.</i> , 1999).....  | 24 |
| <b>Figura 12.</b> Formação de compostos derivados do fenilpropano (Fonte: SIMÕES <i>et al.</i> , 1999). ....   | 25 |
| <b>Figura 13.</b> Localização geográfica do estado de Santa Catarina e municípios de Florianópolis e Blumenau.....   | 37 |
| <b>Figura 14.</b> Mapa rodoviário da região de Blumenau com a localização dos municípios de Blumenau, Rodeio e Timbó. ....   | 38 |
| <b>Figura 15.</b> Mapa rodoviário da região de Brusque com a localização deste município. ....   | 38 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16.</b> Aparelho Clevenger modificado (Fonte: GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).  | 42 |
| <b>Figura 17.</b> Rampa de aquecimento 1 do cromatógrafo a gás modelo Shimadzu® 14B do IPT – FURB.....  | 44 |
| <b>Figura 18.</b> Rampa de aquecimento 2 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.....  | 46 |
| <b>Figura 19.</b> Rampa de aquecimento 3 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.....  | 46 |
| <b>Figura 20.</b> Rampa de aquecimento 4 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.....  | 47 |
| <b>Figura 21.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 12/12/00), rampa 04 e injeção de 0,4 µL da amostra. ....                                | 55 |
| <b>Figura 22.</b> Espectro comparativo massa do beta-pineno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 12/12/00).....                         | 56 |
| <b>Figura 23.</b> Espectro comparativo de massa do safrol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper callosum</i> (coleta de 12/12/00).....                           | 56 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper lindbergii</i> (coleta de 01/04/00), rampa 03 e injeção de 0,2 µl de amostra.....                               | 59 |
| <b>Figura 25.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (coleta de 12/12/00), rampa 04 e injeção de 0,2 µL de amostra.....         | 64 |
| <b>Figura 26.</b> Espectro comparativo de massa de dilapiol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (coleta de 12/12/00)..... | 65 |
| <b>Figura 27.</b> Espectro comparativo de massa de apiol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> (coleta de 12/12/00).....    | 65 |
| <b>Figura 28.</b> Espectro de RNM <sup>13</sup> C (25 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do óleo essencial da <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> , folhas frescas (coleta de 14/02/01).....    | 66 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de RNM <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do óleo essencial da <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> , folhas frescas (coleta de 14/02/01).....    | 67 |
| <b>Figura 30.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. (coleta de 31/01/01), rampa 04 e injeção de 0,2 µL de amostra. ....                  | 71 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 31.</b> Espectro comparativo de massa do biciclogermacreno da análise do óleo das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. (coleta de 31/01/01). ..... | 72 |
| <b>Figura 32.</b> Espectro comparativo de massa do espatulenol, da análise do óleo das folhas frescas da espécie <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC. (coleta de 31/01/01). .....      | 72 |
| <b>Figura 33.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 09/12/00), rampa 04 e injeção de 0,2 µL de amostra. ....                    | 80 |
| <b>Figura 34.</b> Espectro comparativo de massa do beta-cariofileno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 09/12/00). ....    | 81 |
| <b>Figura 35.</b> Espectro comparativo de massa do alfa-humuleno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 09/12/00). ....       | 81 |
| <b>Figura 36.</b> Grupos benziloxi, benzílico que se rearranja a íon tropílico e o grupo fenílico. ....   | 82 |
| <b>Figura 37.</b> Espectro de massa de componente não identificado, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie <i>Piper mollicomum</i> (coleta de 09/12/00). ....     | 83 |
| <b>Figura 38.</b> Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth (coleta de 13/05/00), rampa 02 e injeção de 0,2 µL de amostra.....          | 86 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |  |
|----------------|--|
| C.A.S.         | - Chemical Abstract Standard                               |
| CBM            | - Concentração Bactericida Mínima                          |
| CCD            | - Cromatografia em Camada Delgada                          |
| C.DC.          | - Anne Casimir Pyramus de Candolle                         |
| CG-EM          | - Cromatografia a gás, acoplada com espectrômetro de massa |
| CIM            | - Concentração Inibitória Mínima                           |
| CoA            | - Coenzima A   |
| DMAPP          | - Dimetilalilpirofosfato                                   |
| FPP            | - Farnesilpirofosfato                                      |
| FURB           | - Fundação Universidade Regional de Blumenau               |
| GGPP           | - Geranilpirofosfato                                       |
| H.P.L.C.       | - High Performance Liquid Chromatography                   |
| IAPAR          | - Instituto Agrônomo do Paraná                             |
| IPP            | - Isopentenilpirofosfato                                   |
| IPT            | - Instituto de Pesquisas Tecnológicas                      |
| I.R. Lit.      | - Índice de Retenção da literatura                         |
| I.R. Obs.      | - Índice de Retenção observado                             |
| Kunth          | - Karl (Carl) Sigismund Kunth (1788-1850)                  |
| Miq            | - Miquel, Friedrich Anton Wilhelm (1811-1871)              |
| $\mu\text{L}$  | - microlitro   |
| $\eta\text{m}$ | - Nanômetro  |
| O.M.S.         | - Organização Mundial da Saúde                             |
| OPP            | - Orto-fenilfenol  |
| R.N.M.         | - Ressonance Nuclear Magnetic                              |
| T.R.           | - Tempo de Retenção  |
| U.F.C.         | - Unidade Formadora de Colônia                             |
| UFPR           | - Universidade Federal do Paraná                           |

- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
- U.V. - Ultravioleta
- Yunck - Truman George Yuncker (1891-1964)

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas espécies do gênero *Piper*, da família Piperaceae de ocorrência no Vale do Itajaí, em Santa Catarina, onde os perfis químicos de seus óleos essenciais foram analisados.

Sete espécies de Piperáceas foram estudadas, sendo elas: *Piper caldense*, *Piper callosum*, *Piper mollicomum*, *Piper regnellii* var. *pallescens*, *Piper regnellii* var. *regnellii*, *Piper lindbergii* e *Piper gaudichaudianum*. As espécies *Piper caldense*, *Piper Mollicomum* e *Piper gaudichaudianum* foram coletadas no Parque São Francisco de Assis, município de Blumenau. Já as espécies *Piper callosum* e *Piper regnellii* var. *pallescens* foram coletadas na Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas do município de Rodeio. A espécie *Piper regnellii* var. *regnellii* no campus I da Universidade Regional de Blumenau e no município de Brusque e ainda a *Piper lindbergii* no bairro Salto Weissbach, em Blumenau.

Verificou-se através da destilação por arraste de vapor que a espécie *Piper caldense* não apresenta quantidade significativa de óleo essencial, inviabilizando seu estudo. Nas demais espécies foram encontradas teores de óleo variando entre 0,1 e 0,7% onde, após análise instrumental por CG-EM e índice de retenção, suas respectivas composições foram determinadas, destacando-se os principais constituintes por espécie: *Piper callosum*, safrol (60%); *Piper regnellii* variedade *pallescens*, apiol (54%) e dilapiol (18%); *Piper regnellii* variedade *regnellii*, beta-pineno (20%), biciclogermacreno (8%) e espatulenol (9%); *Piper mollicomum*, alfa-pineno (10%), beta-pineno (18%), trans-cariofileno (10%); *Piper gaudichaudianum*, alfa-humuleno (6%), alfa-selineno (5%), beta-selineno (5%), espatulenol (5%) e óxido de cariofileno (6%); *Piper lindbergii*, óxido de cariofileno (19%).

Posteriormente, utilizou-se o óleo essencial das espécies *Piper callosum*, *Piper mollicomum* e *Piper regnellii* var. *regnellii* para avaliar a sua atividade antimicrobiana. A espécie *Piper mollicomum* apresentou atividade inibitória ao crescimento bacteriano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The present work describes the systematic study related to seven *Piper* genus species (*caldense*, *callosum*, *mollicomum*, *regnellii* var. *pallescens*, *regnellii* var. *regnellii*, *lindbergii* and *gaudichaudianum*) from the Atlantic Rainforest in the Itajaí Valley in Santa Catarina State, searching for representatives that are essential oil producers.

Furthermore it aims to determine their chemical composition both from a qualitative and quantitative point of view and the antibacterial activity of these essential oils.

*Piper caldense*, *Piper mollicomum* and *Piper gaudichaudianum* were collected at Parque São Francisco de Assis in Blumenau city. *Piper callosum* and *Piper regnellii* var. *pallescens* were collected at Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas, in Rodeio. *Piper regnellii* var. *regnellii* at FURB - Campus I and also in Brusque. Finally, *Piper lindbergii* was collected in Salto Weissbach in Blumenau.

By hidrodistillation, it was observed that *Piper caldense* doesn't present significant contents in essential oil, whereas the other species have 0.1 – 0.7% yield. *Piper regnellii* var. *pallescens*, has predominantly arylpropanoids, namely apiole (54%) and dillapiole (18%); *Piper regnellii* var. *regnellii* beta-pinene (20%), bicyclogermacrene (8%) and spathulenol (9%); *Piper callosum*, safrole (60%); *Piper mollicomum*, alpha-pinene (10%), beta-pinene (18%), trans-caryophyllene (10%); *Piper gaudichaudianum*, alpha-humulene (6%), alpha-selinene (5%), beta-selinene (5%), spathulenol (5%) and caryophyllene oxide (6%); and *Piper lindbergii*, caryophyllene oxide (19%), respectively.

Finally, antibacterial bioassay was performed against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by agar diffusion method employing *mollicomum*, *regnellii* var. *regnellii* and *callosum* essential oils. *Mollicomum* showed significant inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The others were inactive.

## 1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, conhecida também como Floresta Atlântica ou Floresta Ombrófila Densa possui uma rica biodiversidade com uma valiosa fonte de espécies vegetais, muitas delas pouco estudadas, constituindo-se então, num grande acervo biológico para a investigação científica (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

Dentre estas espécies de ocorrência na Mata Atlântica do Vale do Itajaí, em Santa Catarina, estão as da família *Piperaceae*, compreendendo principalmente os gêneros *Piper* e *Ottonia*, e com menor representatividade, o gênero *Peperomia*. Ao gênero *Piper*, está associado a elevada potencialidade para a produção de óleo essencial (REITZ *et al.*, 1984).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de algumas plantas que constituem um importante grupo químico de matérias primas utilizada em diversos ramos da indústria, notadamente da perfumaria, farmacêutica, cosmética e de alimentos, mas pouco exploradas no Brasil. Os óleos essenciais poderiam ser utilizados "*in natura*" ou como precursores na síntese orgânica de outras substâncias de maior valor agregado.

A falta de investimento em pesquisa na área de óleos essenciais faz com que o Brasil seja um país que, tradicionalmente, exporta óleos essenciais brutos para outros países. Estes óleos são vendidos simplesmente como matérias primas baratas e seus compradores lhes agregam valor através da manufatura dos mesmos, como a purificação, destilação, isolamento de constituintes e modificações químicas. Portanto, um grande auxílio na nossa economia poderia ser dado, se deixássemos de ser somente produtores de insumos, mas sim de manufaturados.

Outro fator importante a ser considerado é que, na região do Vale do Itajaí a agricultura é uma das grandes fontes da economia de subsistência, principalmente dos colonos, que na maioria são descendentes de imigrantes europeus que ainda vivem no meio rural. Estes poderiam utilizar-se da mata nativa como fonte de novas culturas agrícolas com maior rentabilidade que as tradicionais. Isto estimularia a permanência do homem no campo,

ampliando a atividade agrícola com novas culturas, evitando o êxodo rural, sendo também um indutor de preservação da mata nativa.

Além disto, é de conhecimento geral que o uso popular de plantas nativas é muito grande no Brasil, porém, poucas destas plantas foram estudadas cientificamente. Assim, com um país que possui um território tão vasto e com uma riqueza abundante de espécies vegetais, existe um campo incomensurável para a realização de pesquisas que são de suma importância para o desenvolvimento do nosso país e de toda a humanidade. O ser humano deve voltar a atenção para o nosso planeta cuja biodiversidade vêm sofrendo constante redução, com a conseqüente extinção de espécies jamais estudadas ou que já se extinguíram sem sequer o homem conhecê-las.

A escassez de informações científicas, contrastada com o grande consumo de plantas medicinais popularmente utilizadas no nosso país faz com que um enorme arsenal terapêutico possa ser descoberto, além de representar um importante fator que auxilie a economia brasileira para desenvolver tecnologia de ponta na produção de fármacos.

O propósito deste trabalho está justamente em estudar a composição de óleos essenciais de espécies vegetais do gênero *Piper*, da família *Piperaceae*, existentes na Mata Atlântica do Vale do Itajaí, situada no estado de Santa Catarina, notadamente na região de Blumenau, que possui uma das mais completas descrições florísticas, mas tímida análise fitoquímica. Dentre as várias espécies encontradas nesta região, escolheu-se as espécies *Piper caldense*, *Piper callosum*, *Piper mollicomum*, *Piper regnellii* variedades *regnellii* e *pallescens*, *Piper lindbergii* e *Piper gaudichaudianum* para o desenvolvimento do presente estudo.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

No desenvolvimento das diversas civilizações, desde a mais remota antiguidade, já havia uma estreita relação entre o homem com os vegetais, influenciando e determinando os hábitos como, alimentação, vestimenta e cura de enfermidades. Provavelmente, o uso das plantas no tratamento de moléstias tenha iniciado na aplicação empírica que através de sucessivas observações, propuseram o seu uso na medicina, e durante séculos as plantas medicinais foram a base da terapêutica (SIANI *et al.*, 2000).

A utilização de óleos essenciais na medicina é conhecida há muitos anos. Existem registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza, e à busca de bem estar físico, através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, sementes, flores, etc. As substâncias aromáticas também eram populares na antiga China e Índia, há centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incensos, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

O alemão Alan Lonicir, em 1551, publicou a primeira obra contendo referências para uso médico de ervas e óleos de sementes aromáticas, o “*Kraüterburch*”. O termo Aromaterapia foi cunhado pelo químico francês M. Gatefossé, a partir da experiência em acelerar sua própria convalescença das queimaduras sofridas após um grave acidente em seu laboratório, utilizando a essência de lavanda (SIANI *et al.*, 2000).

No Brasil, em 1819, foi criado o primeiro laboratório químico para a análise de insumos e produtos que vinha atender as necessidades geradas na criação do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A partir do século XIX, com o avanço tecnológico, passou-se a extrair e

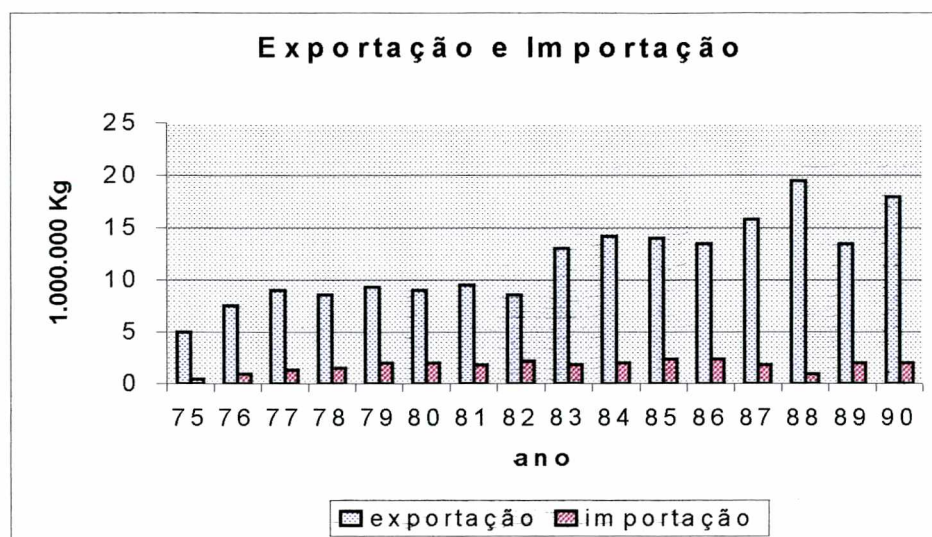
modificar as substâncias ativas, chegando até, em algumas vezes potencializar a atividade das mesmas (MIGUEL, 1996).

Foi no ano de 1940, que o Industrial Otto Grimm iniciou, na localidade de Ribeirão do Tigre, município de Rio do Sul, Estado de Santa Catarina, Brasil, em escala industrial, a produção de uma essência obtida por destilação a vapor dos troncos de árvores, denominadas, naquela localidade, de “canela sassafrás”. Este foi o grande marco da extração, em escala industrial, do óleo essencial do tronco de diferentes espécies de *Ocotea sp.*, encontrada no sul do Brasil e popularmente conhecida como Sassafrás (GEMBALLA, 1955; RIZZINI, 1971).

O Sassafrás sempre foi muito utilizado pelos índios por suas propriedades medicinais, sendo que os espanhóis o descobriram na Flórida – EUA em 1538 (TESKE & TRENTINI, 1995). Seu consumo obteve grande aumento e popularidade, tanto a nível nacional, como internacional (RIZZINI & MORS, 1976).

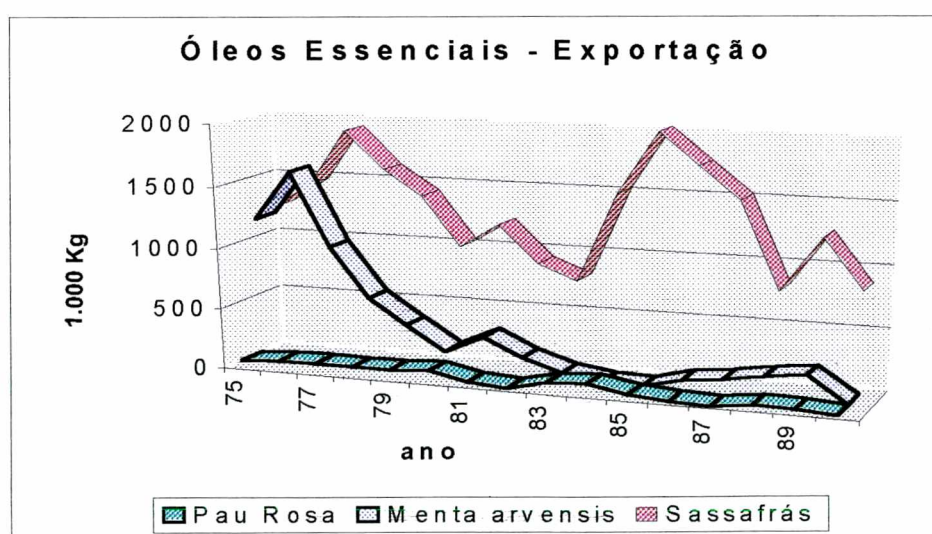
A primeira Farmacopéia Brasileira, publicada em 1929, já cita o Sassafrás em suas monografias. Nesta Farmacopéia, esta planta, foi denominada na época como “*Sassafrás sassafras* (Linné) Karsten, família *Lauraceae*”. Já havia informações sobre descrição botânica, microscópica, ensaio de qualidade (somente cinzas), características degustativas da planta como possuindo cheiro característico, forte e aromático e sabor fracamente mucilaginoso, adstringente, aromático e um tanto acre. O método de extração indicado é a destilação a vapor das raízes e seus usos na forma de pó de sassafrás (*Pulvis sassafras*) e essência (*Oleum sassafras aethereum*) (SILVA, 1929).

Estudo realizado por um grupo de pesquisadores do IAPAR (1995), visando verificar a situação do comércio exterior relativo a exportação e importação de plantas medicinais e aromáticas, estabeleceu informações importantes em relação aos óleos essenciais. Este estudo fez levantamento de dados de compilação bibliográfica, além de consulta a base nos dados da quantidade em toneladas e o valor em dólar (US\$) de importação e exportação de Óleos Essenciais no período de 1975 a 1990. Segundo este, podemos verificar que o volume exportado de óleo essencial pelo Brasil sofreu um aumento significativo neste período (Figura 01).



**Figura 01.** Taxa de exportação e importação Brasileira de Óleos Essenciais em toneladas de produto entre os anos de 1975 e 1990 (Fonte: IAPAR, 1995).

O óleo essencial de laranja contribuiu, em termos de volume, com 77,08% de todo o volume exportado de óleo neste período, e em valor, com 25,22%. Depois do óleo essencial de laranja, o principal óleo essencial exportado foi o de sassafrás, que contribuiu com 11,98% da quantidade exportada, e 22,93% do valor total do período, seguido pelo de *Mentha arvensis* com 4,30 % e 21,85 % e o de pau-rosa com 0,77 % e 6,24%, respectivamente (IAPAR, 1995).



**Figura 02.** Índices de exportação em peso das espécies *Mentha arvensis*, Sassafrás e Pau Rosa no período entre 1975 e 1990 (Fonte: IAPAR, 1995).

Analisando a figura 02, verificamos que o óleo essencial de sassafrás obteve grande consumo e que, no final da década de 80, houve um decréscimo no seu volume exportado pelo Brasil. E por que isto ocorreu? Para se extrair o óleo essencial desta planta, temos que utilizar seu tronco (GUENTHER, 1950). Assim, com o passar dos anos, muitas árvores foram derrubadas, sem que houvesse um estudo ambiental e reflorestamento da mesma. Desta forma, a atividade extrativista atingiu níveis comprometedores, inviabilizando sua continuidade.

Com este fato, surgiu a idéia de procurar substituir este óleo por outro similar. Em primeiro lugar, o principal componente do óleo essencial de sassafrás é uma substância denominada SAFROL (RIZZINI & MORS, 1976). Utilizando este parâmetro, surgiram vários estudos na busca de espécies que contenham óleo essencial com este componente químico. Verificou-se que a família PIPERACEAE possui espécies que contêm safrol como constituinte do óleo essencial, e por muito tempo, pesquisadores voltaram sua atenção para esta família, na busca de quais seriam as espécies e quais partes da planta teriam maior teor de óleo essencial e de safrol. Uma grande vantagem obtida utilizando espécies da família Piperaceae, para a extração de óleo essencial, em relação ao safrol, é a de que, as folhas geralmente contêm grande teor de óleo essencial, em relação a outras partes da planta. Após estudos com algumas espécies da família Piperaceae, pesquisadores notaram que outros componentes importantes quimicamente, além do safrol, são encontrados em óleos essenciais destas plantas. Com isto, hoje não só o safrol é o grande foco para pesquisas de componentes de óleos essenciais de espécies Piperáceas, mas outros princípios ativos que possuem grande importância química e farmacológica estão sendo pesquisados (CONSTANTIN *et al.*, 2001).

Além disto, atualmente estima-se que exista no mundo cerca de 500.000 espécies vegetais das quais 60 a 70 % delas se encontram na América Latina, principalmente nas florestas tropicais úmidas, onde, pode-se afirmar que cerca de 10 % devem apresentar atividade biológica, podendo ser uma importante fonte de fármacos. Somente no Brasil, são encontradas cerca de 120.000 espécies, onde a grande maioria sequer foi estudada sob o ponto de vista fitoquímico (MIGUEL, 1996).



Na lista de espécies vegetais ameaçadas de extinção da Mata Atlântica, estão muitas orquídeas da serra, algumas árvores de grande porte, o sassafrás e os populares palmito e xaxim (SCHLENKER, 1996).

Este imenso patrimônio natural que é a Mata Atlântica ainda precisa ser bem estudado, pois se sabe que esta mata é uma importante reserva da biosfera, abrigando uma das maiores biodiversidades do planeta e entre elas estão as Piperáceas.

## 2.2 Descrição Botânica e Características de Óleos Essenciais de Espécies do gênero *Piper*

Os termos *Piperaceae* e *Piper* são nomes latinos provenientes do Grego *peperi*, que por sua vez, se origina do árabe *babary* (pimenta do reino) (REITZ, 1978). O nome genérico *Piper* deriva-se provavelmente também do sânscrito, referindo-se ao sabor picante e ao aroma das sementes da *Piper nigrum* L. (ATAL *et al.*, 1975).

Theophrasto (234 a.C.), Dioscórides e Plínio (1º século d.C.) já faziam menção à pimenta como artigo principal no comércio entre a Índia e Europa. Riquezas advindas do comércio com a pimenta ajudaram a construir Gênova e Veneza e foi, também devido a ela, que o português Vasco da Gama descobriu o caminho marítimo para as Índias no século XV, facilitando assim a expansão colonial de nações européias (ATAL *et al.*, 1975).

As plantas desta família estão distribuídas por todo o mundo tropical e subtropical (CRONQUIST, 1981). Predominam os representantes herbáceos ao lado de variados tipos de trepadeiras, arbustos e árvores. As folhas são sempre inteiras, comumente alternadas, com estípulas às vezes simulando bainha. Caule freqüentemente articulado. Inflorescência do tipo espiga, com flores muito pequenas que formam frutos drupáceos (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

A Família Piperaceae possui cerca de 1400 espécies que estão subdivididas em 5 gêneros, chamados: *Ottonia*, *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe* e *Sarcorrhachis* (REITZ, 1978).

Yuncker (1972 e 1973) faz um breve apanhado histórico de estudos e publicações realizadas sobre a família Piperaceae, sendo algumas citadas neste parágrafo. O primeiro trabalho que tratou especificamente das Piperáceas do Brasil é de Veloso que, em 1825, descreveu doze espécies em sua obra “Flora Fluminensis”. Em 1839, Kunth, em um trabalho

sobre o gênero *Piper* das Américas e Índias Ocidentais, incluiu descrições de novas espécies brasileiras, baseado nas coleções de Sellow, Gaudichaud, Luschnath e Lhotsky. Miquel, em 1843 e 1844 na sua monografia “Systema piperacearum” inclui todas as espécies conhecidas até o momento. Seguindo este trabalho, em 1852, na “Flora Brasiliensis” Martius reconhece 82 espécies de *Piper*, 53 de *Peperomia*, 4 de *Pothomorphe*, 19 de *Ottonia*, 4 de *Eckea*, 5 de *Peltobryon* e 2 de *Arthante*, totalizando 169 espécies. Mais tarde os últimos 3 gêneros foram incluídos no gênero *Piper*. De Candolle, uma das maiores sumidades em Piperaceae, em 1869, no “Prochomus” apresenta uma monografia da família, com muitas espécies novas, sendo muitas delas da América do Sul.

Em 1978, Reitz descreve a família da Pimenteira, antiga denominação popular da família Piperaceae, como segue:

FLORES - aclamídeas, mínimas, esparsas ou congestas, andrógenas ou unissexuadas, protegidas por bractíolas pediculadas, sacado - galeadas ou peldadas ou sésseis, com peltas de diferentes formatos, dispostas em espigas umbeladas (*Pothomorphe*) ou não (*Piper*, *Peperomia*, *Sarcorrhachis*) ou em ráceros (*Ottonia*), dispostas oxilarmente às folhas (*Sarcorrhachis*) ou opostas às mesmas, terminais ou laterais, pedunculadas;

ESTAMES - nas espécies brasileiras, 2-6, livres ou aderentes às paredes do ovário, anteras rimosas, bitecas ou unitecas;

OVÁRIO - súpero, séssil (*Peperomia*, *Piper*, *Sarcorrhachis* e *Pothomorphe*), geralmente imerso na raque, ou pediculado (*Peperomia*, *Ottonia*), unicelular, uniovulado, com estigmas de 1-5 de forma variada, estiloso ou não;

ÓVULO - basal, ortótropo;

DRUPAS - sésseis ou pediceladas, podendo ser os pedículos verdadeiros ou falsos;

ENDOSPERMA - escasso, apresentando perisperma;

ARBUSTOS OU ARVORETAS - terrestres ou epífitas;

FOLHAS - estipuladas, alternadas, opostas ou verticiladas, inteiras, sésseis ou pecioladas de consistência e formatos os mais diversos, bem como de indumento muito variado, geralmente dotadas de glândulas translúcidas;



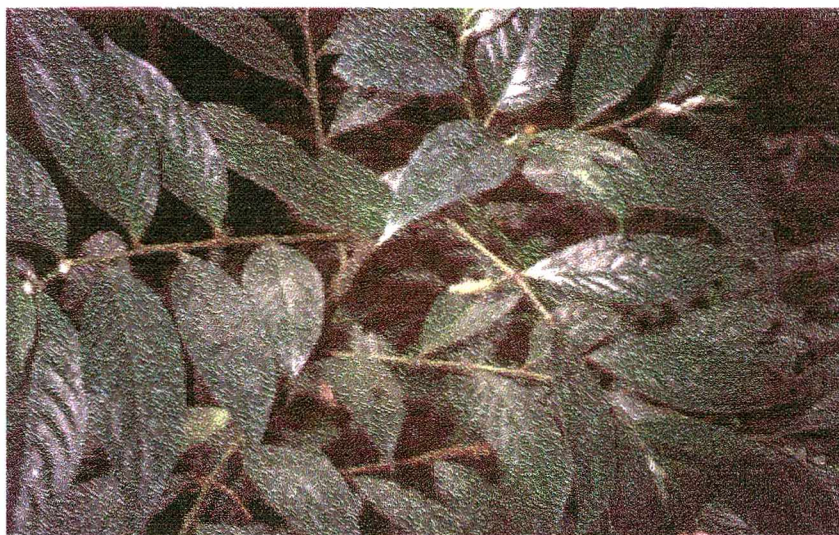
A seguir, descreve-se diferentes espécies de Piperáceas relatadas neste trabalho, bem como outras espécies já estudadas anteriormente por outros pesquisadores.

### 2.2.1 *Piper caldense* C. DC.

Segundo Côrrea (1926 a 1978), outras denominações oficiais são atribuídas a esta espécie, como *Piper pseudolanceolatum* C. DC., *Piper pardinum* C. DC., *Piper resacatum*.

Constitui-se de um arbusto glabro, suavemente arborizado, com internodos superiores de 2 – 5 cm ou mais longo e com pontilhados glandulares. Suas folhas são oblonga-lancetar-elíptica, com ápice acuminata e cuspidata, e base inequilateralmente aguda a cuneada, um lado acima de 2 – 4 mm mais curto que o pecíolo, com pontilhados glandulares, com nervos de 5 a 7 ou 8 a 10 de cada lado, com pequenos intermediários e conectadores transversais (CÔRREA, 1926 a 1978).

Na figura 03 apresenta-se a fotografia de folhas e infrutescência da espécie *Piper caldense* C.DC, encontrada no município de Blumenau - SC.

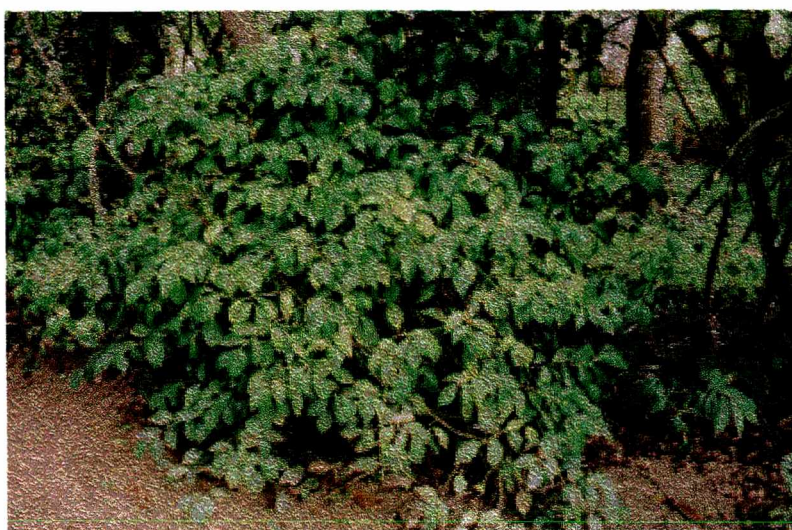


**Figura 03.** Fotografia da espécie *Piper caldense* C. DC. retirada no Parque Municipal São Francisco de Assis.

### 2.2.2 *Piper callosum*

Oficialmente conhecida também como *Schilleria callosa* KUNTH, *Peltobryon callosum* MIQ., *Peltobryon poeppigii* KLOTZSCH in Miq., *Piper poeppigii* C.DC. in DC., *Piper poiretianum* C.DC., *Piper callosum* var. *franciscoanum* C.DC. e *Piper benianum* TREL. É popularmente chamado de “Elixir Paregórico”, pela sua utilização do chá das folhas para debelar males gastro-intestinais, “Óleo Elétrico” e, em Manaus, de “Panquilé”. A *Piper callosum* é encontrada na forma cultivada nos lares da população do interior da Amazônia (MAIA *et al.*, 1987).

É uma planta subarbustiva perene autóctone do Brasil equatorial. Possui subarbusto de caule e ramos nodosos. Folhas alternadas, oblongo - acuminadas, com as nervuras proeminentes na face ventral. Flores diminutas, amareladas, dispostas em espigas carnosas. As folhas exalam aroma de noz moscada. Prefere regiões quentes e úmidas. É esciófita. Em regiões subtropicais o crescimento é muito lento. Desenvolve-se melhor em solos húmidos ou ricos em matéria orgânica, porosos, leves e férteis (CÔRREA, 1926 a 1978). A figura 04 mostra uma fotografia da espécie *Piper callosum* localizada no município de Rodeio - SC.



**Figura 04.** Fotografia da espécie *Piper callosum* retirada na Congregação das Irmãs Franciscanas do município de Rodeio.



Esta espécie possui rendimento de 1,9% de óleo (folhas frescas), composta principalmente por safrol (64%), beta pineno (13%) e alfa pineno (7%) (MAIA *et al.*, 1987).

### 2.2.3 *Piper lindbergii* C. DC. *in* DC.

Esta espécie trata-se de um arbusto de médio porte, podendo chegar a 2 metros de altura ou mais. Seus internodos superiores resistentes, glabro e com 3 a 6 cm ou mais de comprimento. Possui folhas elíptica-ovaladas, com um dos lados do pecíolo de 2 a 4 mm mais curto que o outro lado. Esta espécie é intimamente semelhante com a *Piper amplum* KUNTH, diferindo, contudo, em algumas características, como a desta possui folhas mais elípticas (CÔRREA, 1926 a 1978).

Na figura 05 pode-se observar uma fotografia da espécie *Piper lindbergii* C. DC. *in* DC. retirada no bairro Salto Weissbach, município de Blumenau.



**Figura 05.** Fotografia da espécie *Piper lindbergii* C. DC. *in* DC. retirada no bairro Salto Weissbach, município de Blumenau.

#### 2.2.4 *Piper regnellii*

Pesquisadores da Universidade de São Paulo identificaram fenilpropanóides e neolignan nas raízes da espécie *Piper regnellii*. Dentre os fenilpropanóides, encontramos o apiol, dilapiol e miristicina (BENEVIDES *et al.*, 1999). Já na constituição de seu óleo essencial, o mesmo grupo de pesquisa encontrou mirceno (52,6%) e linalol (15,9%) como principais constituintes (CONSTANTIN *et al.*, 2001).

##### 2.2.4.1 *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) Yuncker

Espécie conhecida popularmente como Pariparoba Paranaense e oficialmente como *Schilleria populifolia* KUNTH, Linnacea; *Piper populifolium* KUNTH, Linnacea; *Piper kunthianum* STEUD.; *Artanthe populifolia* Miq.; *Piper pallescens* C.DC., Linnacea; *Piper flabellinerve* C.DC. Esta espécie é inteiramente glabra, de coloração pálida na secagem e com folhas oval arredondadas (CÔRREA, 1926 a 1978). A figura 06 mostra uma fotografia da espécie *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) Yuncker retirada na Congregação das Irmãs Franciscanas do município de Rodeio.



**Figura 06.** Fotografia da espécie *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) Yuncker retirada na Congregação das Irmãs Franciscanas do município de Rodeio.



#### 2.2.4.2 *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii*

Também chamada popularmente de Caapeba, Capeba ou Pariparoba e oficialmente de *Artanthe regnellii* Miq., Linnaceae; *Piper epunctulatum* C.DC. in DC.; *Piper fulvescens* C.DC. in MORONG & BRITTON; *Piper fulvescens* var. *subglabrum* C.DC.; *Piper fulvescens* var. *geraense* C.DC.; *Piper regnellii* var. *glarius* C.DC.; *Piper regnellii* var. *parvifolium* C.DC. Esta espécie se caracteriza por ser uma planta arbustiforme, com cerca de 1 metro de altura; folhas alternadas, grandes, com limbo cordiforme, 18 cm de comprimento; pecíolo de 2,5 – 5,5 cm de comprimento, nervuras pubescentes; inflorescência em amentos opostos aos pecíolos, solitários, menores que as folhas, com pedúnculo pubescente, de cerca de 2 cm de comprimento. Floresce em agosto (CÔRREA, 1926 a 1978).

Fotografia da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. . in DC., var. *regnellii* encontrada em Blumenau, no campus da FURB é apresentada na figura 07.



**Figura 07.** Fotografia da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. in DC., var. *regnellii* retirada no Campus I da FURB, município de Blumenau.

A variedade *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. foi pesquisada por um grupo de Belém do Pará, espécies coletadas no campus da Universidade de São Paulo, onde obtiveram rendimento de 0,6% de óleo essencial. Foram identificados como constituintes principais de seu óleo essencial o beta-cariofileno (23,4%), (E)-nerolidol (13,7%) espatulenol (11,1%) e globulol (6,1%) (ANDRADE *et al.*, 1998).

### 2.2.5 *Piper mollicomum* Kunth

Conhecida popularmente como Jaborandi Manso, esta planta também possui outra denominação oficial, *Arthante mollicoma* Miq., que hoje não é mais utilizada.

Na figura 08 encontra-se a fotografia da espécie *Piper mollicomum* Kunth, inclusive da sua infrutescência.



**Figura 08.** Fotografia da espécie *Piper mollicomum* Kunth tirada no Parque Municipal São Francisco de Assis.

Botanicamente, é um arbusto de folhas multinérveas de 12 a 14 cm de comprimento e 5 cm de largura, curto pecioladas, obliquamente oblongo-ovais ou oblongo-



elípticas, mucronulado - acuminadas no ápice, arredondadas ou subcordiformes em base desigual, cerdosas na face ventral, com os pêlos um tanto ásperos, aplanados com a idade e, na dorsal, densa e molemente pubescente, recalcados, o nervo central até metade de seu comprimento, emitindo 5 ou 6 nervos alternos, um tanto ascendentes, indo os superiores até o ápice; pecíolo milimétrico, envaginante na base, cerdoso no dorso e por cima; pedúnculo pubescente, excedendo 2 ou 3 vezes ao pecíolo, com brácteas no ápice, peldadas, de inserção triangular ou elíptica e de margem cerdosa; inflorescência em amentos; baga oboval, glanduloso-pubescente no ápice ou glabra. Os frutos são considerados excitantes e estomáquicos e em alguns casos com as mesmas aplicações das cubebas. As raízes são usadas como desobstruentes (CÔRREA, 1926 a 1978).

#### **2.2.6 *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum***

Oficialmente também conhecida como *Steffensia gaudichaudiana* KUNTH, Linnaea; *Piper salicariaefolium* Kunth, Linnaea; *Artanthe mollicoma* f. *glabrata* Miq.; *Artanthe salicariaefolia* Miq.; *Artanthe gaudichaudiana* Miq.; *Piper obscurum* C.DC., Linnaea; *Piper longipes* C.DC.; *Piper rectinervulum* C.DC.; *Piper gaudichaudianum* f. C.DC.; *Piper gaudichaudianum* var. *Longilimum* C.DC (CÔRREA, 1926 a 1978).

Arbusto nodoso de porte médio podendo ter de 2 a 3 metros de altura, encontrado nas matas situadas em planícies aluviais - várzea (Baixo Vale do Itajaí). Aparece também na vegetação do meio das encostas íngremes, mas em pequeno número. Possui folhas lance-elípticas, lance-ovaladas ou elípticas (REITZ, 1984; CÔRREA, 1926 a 1978).

Rorig & Poser (1991) realizaram estudo com esta espécie, e observaram um rendimento de óleo essencial de 0,30 % (folhas frescas). Identificou-se por cromatografia os seguintes componentes: d-limoneno, citral a (neral), citral b (geranial), geraniol, linalol, cariofileno e para-cimeno. Posteriormente, este grupo de pesquisadores identificou nas folhas frescas desta espécie a seguinte situação: apresentaram pouca concentração de monoterpenos, entre eles, beta-pineno e linalol foram os mais abundantes. Consideráveis teores de

sesquiterpenos principalmente alfa humuleno (37,5%) e beta cariofileno (17,4%) (POSER *et al.*, 1994).

Na figura 09 apresenta-se a fotografia da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum* coletada no município de Blumenau – SC.



**Figura 09.** Fotografia da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum* retirada no Parque Municipal São Francisco de Assis.

A seguir, serão apresentados estudos com piperáceas realizados por diversos pesquisadores.

### *Piper capense*

Pesquisadores de países europeus estudaram espécies encontradas na República de S. Tomé e Príncipe, cerca de 180 milhas da costa do Gabão (África). As folhas da espécie *Piper capense*, possuem na composição de seu óleo essencial beta-pineno (32,5%) e beta-cariofileno (12,6%) (SALGUEIRO *et al.*, 1998).

### *Piper guineense*

Estudos sobre a espécie *Piper guineense* revelaram a presença de derivados de fenilpropanóides na composição de seu óleo. Dilapiol (44,8%), seguido de miristicina (9,8%) foram os principais constituintes (SALGUEIRO *et al.*, 1998).

### *Piper hispidinervium*

Espécie encontrada na Amazônia, conhecida popularmente como “Pimenta longa”, que possui rendimento de 2,7 % (planta seca), havendo quase que exclusividade na presença do safrol (98 %) na constituição do seu óleo essencial (MAIA *et al.*, 1987).

A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), em parceria com o Museu Emílio Goeldi, CPATU e NRI/UK, com suporte financeiro do United Overseas Development Administration – ODA, realiza estudos agrônômicos e ecofisiológicos com esta espécie, visando a recomendação de um sistema de produção econômica e ecologicamente adequado para a exploração desta Piperaceae como fonte de safrol (FREITAS, 1995).

### *Piper marginatum*

O rendimento de óleo essencial é de 1,4 % (folhas frescas) possuindo a seguinte composição: 33,3 % álcoois sesquiterpênicos, 25 % para-cimeno, 25 % etilpiperonilcetona, 7 % monoterpenos, 4,7 % sesquiterpenos e 4,2 % safrol (SILVA *et al.*, 1971).

### *Piper lhotzkyanum* Kunth

Ensaio preliminares realizados por pesquisadores do Rio de Janeiro da espécie *Piper lhotzkyanum* Kunth (sinônimo *Piper inversum* C.DC. e *Piper aromaticum* C.DC., *Piper damazii* C.DC., *Piper benetianum* C.DC. e *Piper santa-barbaranum* C.DC.) apresentaram a presença de cromenos e derivados de ácido benzóico. A composição do seu óleo essencial

apresentou uma diversidade de componentes compostas por sesquiterpenos, com ou sem grupos oxigenados. Os hidroxi-sesquiterpenos encontrados em alta concentração foram: beta eudesmol (24,80%), alfa eudesmol (20,62%) e guaiol (9,67%) (MOREIRA *et al.*, 1998).

### *Piper mikanianum*

Pesquisadores do Rio Grande do Sul também estudaram esta espécie, onde obtiveram 0,25% de óleo essencial (folhas frescas) com a seguinte composição: d-limoneno, citral b, geraniol, mirceno, alfa felandreno, canfeno, eugenol, cariofileno e para-cimeno (RORIG & POSER, 1991). Posteriormente, este grupo de pesquisadores identificou nas folhas frescas uma diversidade de constituintes, sendo os majoritários, limoneno (14,8%), biciclogermacreno (14,3%) e beta cariofileno (10,5%) (POSER *et al.*, 1994).

Através de estudos diversos realizados no estado de Santa Catarina, esta espécie apresentou como seu principal constituinte a substância safrol, com 0,41 % de rendimento de óleo essencial. Porém, o safrol não foi encontrado em estudos realizados nas espécies existentes no Rio Grande do Sul e Paraná (ZIMERMANN, 1999).

O óleo essencial da variedade *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel coletado em Atalanta, região da Mata Atlântica do estado de Santa Catarina. Foi analisado por pesquisadores da Fundação Regional de Blumenau e Universidade Federal do Paraná e obtiveram-se 82% de safrol na sua constituição. Este resultado comprova novamente a existência do safrol em grandes concentrações na espécie catarinense (ABREU *et al.*, 2001B).

### *Piper nigrum*

Pesquisadores europeus estudaram a espécie *Piper nigrum*, e encontraram limoneno (18,8%), beta cariofileno (15,4%), sabineno (16,5%) e beta-pineno (10,7%) no óleo essencial dos seus frutos (SALGUEIRO *et al.*, 1998).



### ***Piper solmsianum* C.DC.**

Ensaaios preliminares realizados também por pesquisadores do Rio de Janeiro da espécie *Piper solmsianum* C.DC. (sinônimo *Piper leucathum* C.DC. e *Piper santosanum* C.DC.) apresentaram a presença de neolignanas e flavonóides. A composição do seu óleo essencial revelou a presença de dois componentes principais, os arilpropanóides (sarisan) com 39,23% e monoterpenos (delta 3-careno) com 23,29% de concentração (MOREIRA *et al.*, 1998).

Cinco fenilpropanóides foram identificados de extratos de acetato de etila de folhas e caule da espécie *Piper solmsianum* C.DC., sendo elas: apiol, dilapiol, miristicina, elemicina e isoelemicina (MARTINS *et al.*, 2000).

### ***Piper umbellatum***

Finalmente, estudos realizados na espécie *Piper umbellatum*, revelaram a presença de beta-pineno (26,8%), alfa-pineno (17,6%) e (E)-nerolidol (12,4%) no óleo essencial (SALGUEIRO *et al.*, 1998).

## **2.3 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias flavorizantes e fragrâncias encontradas em diferentes órgãos vegetais pertencentes a diversas famílias. Possuem outras denominações, de acordo com suas propriedades, como: por evaporarem quando expostos ao ar à temperatura ambiente, diferindo dos óleos fixos, são chamados de óleos voláteis; por possuírem aroma agradável e intenso, chamam-se também de essência; e ainda pela solubilidade em solventes orgânicos apolares, como o éter, denominam-se óleos etéreos (BAUER & GARBE, 1985).

Segundo a ISO (International Standard Organization), óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem

como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae) (SIMÕES *et al.*, 1999), ou por secreções, por exemplo, de bálsamos extraídos através de ferimentos em partes das árvores, geralmente seus troncos (BAUER & GARBE, 1985).

Os óleos essenciais são próprios de vários grupos de espécies e são definidos por um conjunto de propriedades como: geralmente são líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, possuem aroma e sabor característicos, volatilidade, insolubilidade em água (lipofílicos); solubilidade em solventes orgânicos usuais; aroma agradável, sendo que alguns possuem cheiro desagradável ou não possuem cheiro (BAUER & GARBE, 1985).

Os óleos podem estar localizados em diferentes regiões na planta, dependendo da espécie a ser estudada. Mas, em uma mesma espécie, os óleos estão localizados sempre no mesmo local, em estruturas chamadas aparelhos secretores, característicos pela forma e conteúdo. Estes aparelhos podem ser apresentados sob diferentes formas: como célula secretora ou isolada como é o caso do capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf), como bolsa secretora no eucalipto (*Eucalyptus* sp.), canal secretor como na erva doce (*Pimpinella anisum* L.), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) ou na forma de pêlo ou tricoma glandular, e este é formado pelo pedicelo ou suporte e pela glândula comum na Família Labiatae (HEGNAUER, 1979). A composição química pode variar significativamente, de acordo com a época do ano e horário de coleta, condições climáticas e de solo. Outro fator a se considerar, é a ocorrência de quimiotipos ou raças químicas, que é freqüente em plantas ricas em óleo essenciais. Estes seriam vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os óleos voláteis são raramente encontrados em gimnospermas (exceto coníferas), angiospermas monocotiledôneas (exceto gramíneas e zingiberáceas). Já as angiospermas dicotiledôneas são ricas nestes óleos, onde se encontram as Piperáceas. Nestas, os óleos essenciais são encontrados em células parenquimáticas diferenciadas.

Com vistas no possível aproveitamento dos óleos essenciais numerosos grupos de estudiosos de plantas estão continuamente em pesquisa em todo o mundo (ZAMBONI, 1983; CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

### 2.3.1 Biogênese e Classificação Química dos Óleos Essenciais

A origem dos óleos essenciais não é bem explicada, mas acredita-se que esteja relacionada com o metabolismo do vegetal, mais especificamente, com o mecanismo de reprodução ou de defesa da planta. Em alguns vegetais, os óleos formados ou elaborados em células e glândulas oleíferas são observados em estado livre. Em outras espécies, são oriundos do processamento físico-químico, como certos desdobramentos que ocorrem em algumas substâncias orgânicas. Por outro lado, em algumas espécies vegetais são estáticos, ou seja, permanecem nos locais de formação até que sejam extraídos por fenômenos alheio à fisiologia da planta, podendo ser extraídos de partes do vegetal onde não existem fontes geradoras de essência (ZAMBONI, 1983).

As reações químicas e bioquímicas responsáveis pelas características do flavor e fragrância são muito complexas. Existem aproximadamente 4.000 tipos de substâncias voláteis já identificadas oriundas de diferentes vias metabólicas. Além disto, a relação estrutura química e atividade de muitos desses compostos permanece desconhecida (ARAÚJO, 1999).

A Teoria Evolucionista prega que, todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características. Isto explica porque, substâncias como lipídeos, protídeos, glicídeos e ácidos nucleicos, são fundamentais a todos os seres vivos, tanto em organismos vegetais quanto animais. Chamamos estas substâncias de metabólitos primários ou macromoléculas.

Outro grupo de substâncias também produzido pelos seres vivos, denominados metabólitos secundários ou micromoléculas, são produtos do metabolismo primário originado às custas de energia. Estes metabólitos, não são necessariamente essenciais para o organismo produtor. Estes geralmente apresentam baixo peso molecular, estrutura complexa, atividade biológica e são encontrados em baixas concentrações e em determinados grupos de seres.

Gottlieb *et al.* (1996), diferencia resumidamente os metabólitos, onde os metabólitos primários são os fornecedores de matéria prima e de energia para a formação dos secundários, sendo estes especiais, pois possuem atividades biológicas muito interessantes.

Harbone (1988) explica a riqueza dos metabólitos secundários na plantas no fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar como os animais. Assim, os vegetais necessitam desta diversidade química como instrumento de defesa contra outras espécies, ou de atração no âmbito da reprodução.

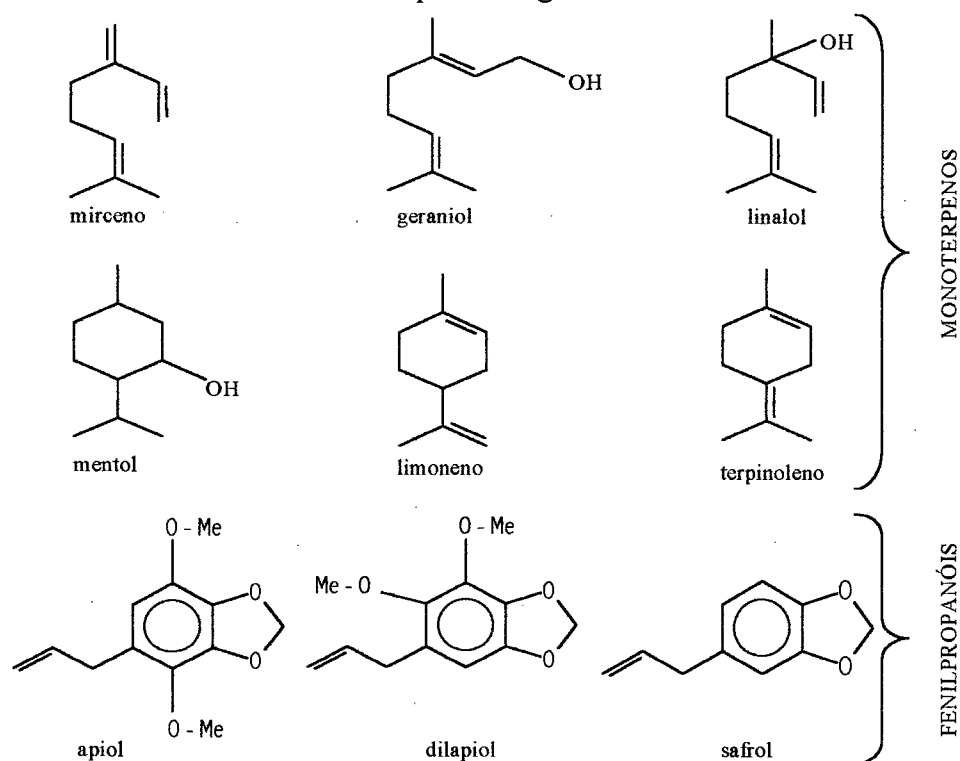
Estudos revelam que os metabólitos secundários também são importantes para a preservação, sobrevivência e perpetuação da espécie no seu ecossistema. Outras propriedades, ou funções ecológicas deste grupo são, a defesa contra herbívoros e microorganismos; proteção contra os raios UV; a atração de animais dispersores de sementes ou de polinizadores, principalmente para plantas com polinização noturna, onde o estímulo atrativo visual é impraticável; proteção contra perda d'água; alelopatia e elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto sua diversidade numa mesma espécie (HARBONE, 1988; WINK, 1990).

A produção dos metabólitos secundários resulta de complexas interações entre a biossíntese, transporte, estocagem e degradação do vegetal (WINK, 1990), e cada um destes, é gerenciado por genes e, portanto, será influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e ambiente (ROBBERS *et al.*, 1996).

Segundo Mann (1987), na maioria das células e organismos, as rotas metabólicas de biossíntese, degradação e interconversão das moléculas e as reações destinadas à conservação de energia (metabolismo primário ou intermediário), são similares entre si. Já as rotas dos metabólitos secundários não são tão gerais e alguns destes metabólitos são somente ativados durante estágios particulares do crescimento e desenvolvimento, ou períodos de estresse, causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico.

Os componentes dos óleos essenciais podem ser divididos de acordo com seus grupamentos químicos, sendo constituídos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos. Os hidrocarbonetos mais freqüentemente encontrados pertencem ao grupo dos terpenos. Podemos encontrar ainda outros grupos químicos como os de estrutura de cadeia longa (7 a 15 carbonos) que possuem baixo ponto de ebulição e são compostos com funções álcool, aldeído ou cetona. Temos ainda os derivados do benzeno ou fenilpropano, por exemplo, o eugenol e safrol. Os óleos essenciais mistos apresentam mais de

um grupo funcional diferente. A figura 10 apresenta alguns componentes comumente encontrados em óleos essenciais de espécies vegetais.

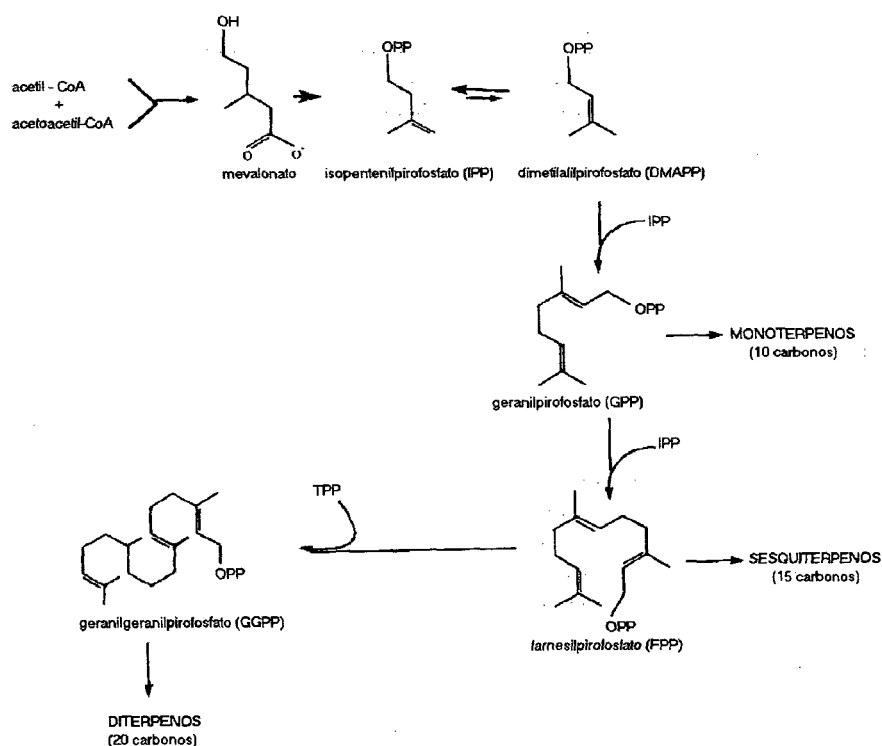


**Figura 10.** Estruturas de alguns componentes de Óleos Essenciais.

Os terpenóides constituem uma vasta variedade de substâncias vegetais, sendo este termo designado para referenciar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno ( $C_5H_8$ ), tendo fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ . A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. Este ácido é formado pela condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Posteriormente, após várias etapas que inclui uma hidrólise com posterior redução do produto formado, origina-se o mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), ou isopreno ativo, a unidade básica na formação de terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato originará moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam trans-geranil-pirofosfato (GPP), a partir do qual formam-se os demais terpenos (SIMÕES *et al.*, 1999).

Possuem grupos funcionais como hidroxila ou carbonila e estes são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, que variam de dois a oito: os monoterpenos, ou simplesmente terpenos possuem duas unidades de isopreno com dez carbonos; os sesquiterpenos, três unidades; e os diterpenos quatro unidades de isopreno. O aroma e odor destes hidrocarbonetos são muito baixo, comparado com os seus derivados oxigenados. Portanto, o seu odor é sempre reduzido (ARAÚJO, 1999).

Os terpenos ainda podem ser divididos pelo número de componentes cíclicos existentes na sua estrutura. Assim temos, os acíclicos, exemplificados pelo mirceno e o geraniol; os monocíclicos, como o mentol e limoneno; os bicíclicos como cânfora e cineol; os tricíclicos como ácido abiético e ainda os sesquiterpenos como é o caso do guaiazuleno. A figura 11 mostra a biossíntese dos terpenos.

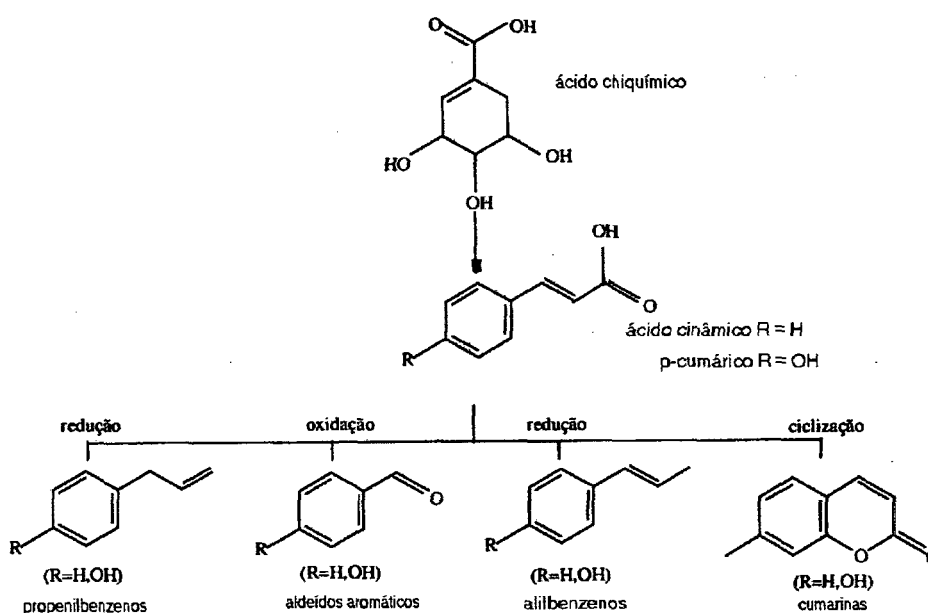


**Figura 11.** Biossíntese de Terpenos (Fonte: SIMÕES *et al.*, 1999).

A síntese dos terpenos oferece uma reserva de variedades químicas, disponíveis para determinadas funções biológicas dentro de um vegetal (algumas pouco conhecidas), não constituindo um mero adorno para este (SILVA *et al.*, 1992). Segundo BREITMAIER (1999),

o número de compostos terpênicos e fenilpropanóides conhecidos ultrapassa a 8.000 e WAGNER (1993) estima que existam um número superior a 150 de monoterpenos e 1000 de sesquiterpenos.

Já os derivados do fenilpropano, se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Os ácidos cinâmicos são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides, compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático. Estes, por meio de reduções enzimáticas, produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, por meio de oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos (SIMÕES *et al.*, 1999). A figura 12 mostra a formação de compostos derivados do fenilpropano.



**Figura 12.** Formação de compostos derivados do fenilpropano (Fonte: SIMÕES *et al.*, 1999).

### 2.3.2 Bioatividade dos Óleos Essenciais

Inicialmente, a maior parte das aplicações de pesquisas científicas utilizando óleos essenciais, era voltado ao seu emprego nas indústrias de alimentos, bebidas e perfumaria,

(BAUER & GARBE, 1985) não visando diretamente os aspectos farmacológicos destes óleos. Porém, hoje grande parte dos ensaios farmacológicos são voltados principalmente às propriedades antimicrobianas (CRAVEIRO *et al.*, 1993).

Em contrapartida, uma nova tendência do mercado é justamente o consumo de alimentos com um valor terapêutico agregado, os chamados Nutracêuticos, ou alimentos funcionais. Assim, tanto os óleos essenciais, quanto outros grupos químicos constituintes de plantas, que possuem ação farmacológica, poderão ser incorporados a alimentos, obtendo-se um produto final específico para um determinado público. Isto quer dizer que, ao ingerirmos estes alimentos, nós estamos contribuindo de alguma forma para a prevenção ou melhora na nossa saúde (CALDERARI, 2000).

O termo “Aromacologia” vem se consolidando desde a década de 80 nos meios científicos, em países desenvolvidos, como o Japão, os EUA e na Europa. Este termo trata de lidar com os efeitos resultantes de estímulos alcançados através das vias olfativas até o cérebro, não utilizando vias tradicionais, como a corrente sanguínea, via oral ou transdérmica, esta última, utilizada pela aplicação por massagem (SIANI *et al.*, 2000).

DAVIS (1996) e WORWOOD (1995) descrevem várias citações referentes a propriedades medicinais atribuídas aos óleos essenciais. São algumas delas: adstringente, antimicrobiano, analgésico, antidepressivo, antipirético, antiviral, desodorante, estimulante, imunoestimulante e outros.

SILVA *et al.* (1992) cita diversas atividades biológicas de compostos triterpênicos, dentre elas, a atividade herbicida, antimicrobiana, citotóxica, citostática e anti-tumoral.

Sendo os óleos essenciais metabólitos secundários, geralmente possuem odor agradável, com a propriedade de atrair insetos, pássaros, morcegos, responsáveis pela polinização de muitas plantas.

A atividade germicida de óleos essenciais é bastante estudada. PENFOLD e GRANT (1923) estudaram sistematicamente as propriedades desinfetantes de óleos essenciais australianos. DYCHE-TEAGUE (1924) e BRYANT (1924) verificaram que óleos perfumados eliminam bactérias patogênicas secretadas pelas vias nasais. CHOFRA *et al.*



(1960) analisaram alguns óleos essenciais de plantas medicinais indianas quanto a sua eficácia antimicrobiana, usando o método do disco de papel de filtro para medir zonas de inibição. MARUZZELLA & HENRY (1958) e MARUZZELLA (1963) investigaram a atividade de um número elevado de óleos contra bactérias e fungos, em diferentes diluições e períodos de tempo previamente estabelecidos. RAO & NIGAM (1970) usaram o método de difusão de ágar na determinação da eficiência microbiana “*in vitro*” de óleos essenciais. JAIR & KAR (1972) sugerem o uso de óleos essenciais com atividade bactericida para compor preparações dermatológicas. FARNSWORTH (1966) publicou um artigo com revisão relacionada com uma triagem biológica e fitoquímica de plantas medicinais e, entre elas, várias produtoras de óleos essenciais.

Outro fator importante é a alelopatia (HARBONE, 1988; HARBONE, 1993; RICE, 1984; SILVA *et al.*, 1992), ou seja, a interação entre plantas, onde, em alguns casos, a existência do óleo essencial, principalmente terpenos voláteis, ou outros metabólitos, pode gerar uma competição entre vegetais ou até entre indivíduos da mesma espécie (autopatia). Esta ação inibitória pode ser tão intensa que o desenvolvimento de outras plantas são totalmente inibidas em um raio de 1 a 2 metros, gerando zonas de solo nu em torno dos arbustos dessas espécies. Um exemplo de alelopatia foi descrito por Gusman *et al.* (1990) onde o citrionelol, constituinte do óleo essencial de espécies cítricas, inibiu a germinação de sementes e o crescimento inicial da planta invasora conhecida como leiteiro (*Euphorbia heterophylla*). Estes fatos ajudam a comprovar que os óleos essenciais possuem grande importância na vida das plantas.

A ação tóxica de alguns componentes dos óleos voláteis, como o mentol e mentona, que inibem crescimento de várias larvas, são uma proteção do vegetal para com seus predadores e agentes infestantes (KESLEY *et al.*, 1984). Alguns insetos utilizam óleos voláteis extraídos de plantas para se defenderem de seus predadores, como as formigas, que utilizam o citrionelal e os cupins que utilizam o alfa-pineno, para irritar o predador, fazendo-o desistir do ataque (HARBONE, 1993).

Parece que um certo número de óleos essenciais exerce direta ou indiretamente uma ação definida na transpiração da planta. Entretanto, experiências executadas na saturação

parcial da atmosfera ao redor da planta simulando condições externas demonstraram que a concentração do vapor do óleo essencial seria raramente maior para causar algum declínio significativo na transpiração. A ação de alguns óleos essenciais é similar em certas proporções à dos anestésicos em células animais e este é um dos problemas fundamentais em fisiologia geral. Os resultados obtidos nestes estudos podem ser uma boa contribuição ao discernimento dos efeitos similares nas plantas. O primeiro efeito dos solventes gordurosos, narcóticos e agentes estimulantes é idêntico e pode causar uma baixa reversível de permeabilidade para água e substâncias solúveis em água, causando um impedimento pronunciado da transpiração das plantas (ZAMBONI, 1983).

Segundo LOBATO *et al.* (1989), a espécie *Piper hispidinervium* encontrada na Amazônia, contendo como constituinte principal do óleo essencial o safrol, inibiu o crescimento das espécies *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*.

No campo da Odontologia, mais especificamente, na Endodontia, além do eugenol usado há muito tempo, outros óleos essenciais, como o eucaliptol e o óleo de laranja, estão sendo estudados com o intuito de substituir o clorofórmio, que é um solvente altamente nocivo ao ser humano, como removedor para desintegração da guta percha, cone utilizado durante o tratamento de canal dentário (TEIXEIRA & PASSOLD, 1999).

Segundo FAKIM (1994), espécies do gênero *Piper* são utilizadas pela medicina popular por suas atividades antitumorais. Na ilha Maurício, a espécie *Piper sylvestre* é utilizada popularmente em casos de asma e febre reumática.

A espécie *Piper marginatum* é uma planta amazônica, utilizada na medicina popular como cataplasma e é usada na cura de erisipela e tumores (GOTTLIEB *et al.*, 1981). A *Piper methysticum* Forst (Kava-Kava) é muito utilizada tradicionalmente em algumas ilhas do Pacífico e comercializada na Europa. Suas raízes e rizomas são utilizadas na preparação de bebidas não fermentadas e no tratamento da dor, neuralgia, convulsões, inquietude, insônia. Estudos revelaram a existência de lactonas, denominadas kavalactonas (kavaína e di-hidro-kavaína), responsáveis pela atividade no sistema nervoso central (SIMÕES *et al.*, 1999). Investigações farmacológicas “*in vivo*” indicaram ação sedativa, relacionada com a ativação

da transmissão dopaminérgica e serotoninérgica na região mesolímbica, o que estaria associado com a redução da excitabilidade emocional e alterações comportamentais.

Segundo STASI (1987), foram encontradas nas espécies *Piper gaudichaudianum* e *Piper regnellii* alta atividade analgésica.

As folhas da espécie *Piper capense*, conhecida em S. Tomé (África) como “Fia Boba Piquina” é utilizada como estomáquica e carminativa na indigestão, flatulência e cólica. *Piper guineense*, conhecida como “Pó Pimenta” e, em outros países como “Ashanti pepper” possui ação antibacteriana, usada especialmente na cicatrização de feridas. Os frutos de *Piper nigrum*, conhecida como “Pimenta” é utilizada como condimento e, aplicado externamente, como estimulante, rubefaciente e desinfetante. As folhas de *Piper umbellatum*, conhecida como “Fia Boba d’Obô” são usadas para reduzir inchaços e irritação na pele (SALGUEIRO *et al.*, 1998).

O uso de Produtos Naturais como precursores ou modelos na síntese de substâncias bioativas é um procedimento muito utilizado para a síntese de fármacos (CECHINEL, 2000). Um exemplo é o de Piperamidas naturais usando o safrol como material de partida, também foi relatado por SIMÕES *et al.*, 1999.

Segundo Chen *et al.* (1995), estudo realizado com extrato aquoso da inflorescência da espécie *Piper betle* demonstrou que, injeções intravenosas feitas em camundongos com este extrato e dos seus principais componentes, eugenol (6,2 %) e safrol (78,9 %), apresentaram efeito hipotensivo e bradicardia nestes animais. Contudo, os mesmos foram aplicados por via intraarterial e subraquinóidea, resultando num efeito hipotensor e taquicardia.

Estudos microbiológicos foram realizados com as espécies de *Piper cernuum* e *Piper regnellii* apresentando atividades nos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (CONSTANTIN *et al.*, 2001).

## 2.4 Métodos de Separação

Os óleos podem ser obtidos através de diversas técnicas de extração que variam conforme a localização do óleo volátil na planta e qual será o destino deste. A extração a frio ou enfloração, também originalmente chamada pelos franceses de “*enfleurage*” é empregada nos dias de hoje apenas por algumas indústrias de perfumaria, no caso de pétalas de flores com baixo teor de óleo de alto valor comercial. A extração por solventes orgânicos também não é muito utilizada, pois acaba extraindo juntamente com o óleo volátil, outros compostos lipofílicos, e seus produtos acabam tendo baixo valor comercial. Outro método é a expressão ou prensagem, muito utilizado na indústria de extração de óleos voláteis de frutos cítricos, onde os pericarpos destes frutos são prensados e o óleo é separado (SIMÕES *et al.*, 1999).

Já a destilação pelo vapor d’água, ou destilação por arraste de vapor é utilizada quando os óleos voláteis possuem pressão de vapor mais elevada que a água e formam misturas imiscíveis com a mesma. Os componentes de uma mistura imiscível entram em ebulição a uma temperatura menor que o ponto de ebulição dos componentes individuais. Assim, uma mistura de compostos de alto ponto de ebulição e água pode ser destilada a uma temperatura menor que 100 °C, que é o ponto de ebulição da água. O princípio da destilação a vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais. A pressão total do vapor da mistura torna-se igual à pressão atmosférica em uma temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes.

Na destilação por arraste de vapor utiliza-se o aparelho de Clevenger (CLEVANGER, 1928). O aparelho de Clevenger sofreu modificações objetivando melhorar a qualidade do material e o funcionamento do aparelho, bem como dar condições adequadas para que não haja alterações do óleo essencial depositado no frasco coletor durante a extração (WASICKY & AKISUE, 1969). Este aparelho modificado possui vantagens em relação ao método de extração tradicional de arraste por vapor. Como, por exemplo, poder ser feito um doseamento, ou seja, a quantificação do óleo extraído.

A alteração do aparelho está principalmente condicionada à temperatura de destilação. Em certos aparelhos, o contato da essência com o vapor é permanente, como acontece com o aparelho de Clevenger original, onde a condensação de vapores se faz por refluxo. Além disto, neste aparelho corre-se o risco de perda dos componentes mais voláteis. Estes casos foram resolvidos substituindo-se o condensador de refluxo por um de passagem vertical que, entretanto, apresenta a desvantagem de necessitar aquecimento demasiado para que o vapor atinja o topo do condensador e da fragilidade aumentada devido ao seu tamanho (COCKING & MIDDLETON, 1932; FARMACOPÉIA, 1959; MATOS & WASICKY, 1960).

Diversas foram as propostas de modificações de aparelhos Clevenger. MORITZ (1955) procurou montar um condensador em sentido horizontal, o que evitaria um superaquecimento da essência. Porém, a inconveniência consiste agora em ocupar espaço muito grande, tornando-se o aparelho mais frágil, difícil de limpar e não podendo se realizar leitura de pequena quantidade de óleo essencial.

O aparelho “Karlruhe” por sua vez, é mais completo, apresentando, entretanto, condensador curto, relativamente pouco eficiente, dificultando a limpeza e relativa proximidade do tubo coletor à fonte calorífica (STAHL, 1969).

GOTTLIEB & MAGALHÃES (1960) apresentaram um modelo de aparelho de Clevenger modificado onde, tanto óleos mais densos como menos densos que a água poderiam ser coletados, sendo uma grande vantagem quando se trabalha com plantas ainda pouco estudadas, e desconhece-se a densidade de seu óleo essencial. A figura 16 do item 4.2 desta dissertação mostra o modelo proposto.

WASICKY & AKISUE (1969) aperfeiçoaram o aparelho permitindo determinar diretamente no tubo graduado, tanto o volume de óleo mais denso e menos denso do que a água. Isto evita o superaquecimento do óleo no reservatório e ainda oferece a vantagem de poder executar macro e micro determinações. Neste aparelho, entretanto, o tamanho horizontal do condensador não é tão reduzido quanto num de condensador vertical, o que pode ser um fator negativo em espaços reduzidos. Outro fator é a de que possui maior número

de peças individuais, o que, facilita a substituição das peças, mas, por outro lado, dificulta a montagem.

WASICKY (1963) também modificou o aparelho, colocando dilatações no coletor de óleo essencial, para evitar formação de bolhas de água ou de essência que poderiam interromper a passagem no tubo graduado.

Outro método de extração de óleos essenciais, considerado mais eficiente e que obtém um óleo mais puro, livre de traços de solventes, é a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico. Este método permite recuperar vários tipos de aromas naturais, não somente o óleo volátil, e de modo bastante eficiente. Esta extração consiste em, primeiramente, liquefazer o CO<sub>2</sub> através de compressão e, em seguida, promover aquecimento a uma temperatura superior a 31 °C. Nesta temperatura, o CO<sub>2</sub> atinge um estado físico, onde sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES *et al.*, 1999).

## 2.5 Identificação de Óleos Essenciais

O avanço da tecnologia da análise instrumental tornou os métodos analíticos mais sensíveis e precisos. Atualmente é possível detectar substâncias em concentrações muito baixas. Isto implica na necessidade de processos de separação cada vez mais eficientes, pois existe uma grande dificuldade de obter-se substâncias com o grau de pureza exigido por estes novos métodos analíticos. À medida que se avança na purificação das substâncias, as misturas são formadas por componentes de polaridades muito semelhantes o que dificulta a separação. Faz-se necessário, então, o emprego de diferentes técnicas de separação com o intuito de selecionar as mais adequadas à resolução do problema em questão. Em casos onde há diferença entre grupos funcionais (como a presença de hidroxila ou de carbonila) a separação torna-se mais fácil. Já quando as diferenças são sutis, a etapa de separação e purificação torna-se extremamente complicada.

De modo geral, a ferramenta básica na elucidação e caracterização de óleos essenciais são os métodos utilizando a cromatografia, pois, trata-se de um conjunto de mecanismos separadores baseados no mesmo fundamento físico e na mesma teoria: a distribuição de misturas de substâncias em uma fase estacionária e uma fase móvel.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método bastante utilizado na análise de óleos essenciais, pois permite obter informações sobre um óleo volátil utilizando pouco tempo, pouca amostra, e baixo custo. Podemos utilizar vários tipos de fase estacionária e móvel, além de termos o auxílio do uso de reveladores próprios para determinados grupos químicos. Por exemplo, pode-se usar como fase estacionária a sílica-gel G 457, que possui a propriedade de gerar fluorescência diante da luz ultravioleta (UV) a 457 nm. Esta é uma importante ferramenta para verificar a presença de compostos que possuem anel aromático ou dupla ligação alternada. Quanto à fase móvel, pode-se fazer o uso de solventes com diferentes polaridades, ou até misturas de solventes, gerando diferentes afinidades com a substância a ser separada e variação do RF da mesma.

A cromatografia em coluna utiliza-se geralmente de uma coluna de vidro presa no sentido vertical, onde a fase estacionária é sedimentada e compactada. Além disto, na cromatografia em coluna, pode-se utilizar o artifício de usar várias fases móveis de composição diferente, sempre respeitando uma ordem crescente ou decrescente de polaridade.

A cromatografia a gás consiste na separação de componentes vaporizados, combinando-se princípios de partição, adsorção e volatilidade (ARAÚJO, 1999). Este é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos voláteis. É aconselhada a utilização de colunas capilares para promover a melhor separação dos constituintes, pois esta possui um diâmetro bem menor que as empacotadas e maior comprimento de coluna, o que diminuiria a probabilidade de sobreposição de constituintes no cromatograma (SIMÕES *et al.*, 1999). A escolha da coluna a ser utilizada é de suma importância para o sucesso da análise e identificação. Como o grupo de substâncias que constituem os óleos essenciais é muito grande, as colunas capilares devem ser selecionadas de acordo com a polaridade dos componentes do óleo. São recomendadas as colunas de filme líquido imobilizando a sílica fundida ligada com metil silicone, por exemplo, HP-1® e HP-

PONA<sup>®</sup>; ligada fenil metil silicone, como Ultra 2<sup>®</sup>; carbowax20M como HP-20M<sup>®</sup>; ou ligadas com polietilenoglicol (PEG), como HP-INNOWax<sup>®</sup> (HEWLETT & PACKARD, 1996).

Diferentes técnicas de amostragem são encontrados, como a análise por “Headspace”, onde faz-se amostragem do óleo dentro de um espaço confinado. Neste método ocorre menor modificação química do óleo essencial, pois utiliza baixo aquecimento e a análise é feita do espaço ou gases volatilizados entre a superfície líquida e tampa do recipiente (LINSKENS & ALLEN, 1997).

A diferença básica entre a cromatografia a gás (CG) e a cromatografia a gás com espectrômetro de massa (CG-EM) é que a última além de permitir a separação dos componentes na coluna cromatográfica, pode promover a elucidação da estrutura do componente de seu espectro de massas.

Para se identificar compostos individuais de um óleo essencial, pode-se fazer uma padronização interna ou externa, ou seja, uma comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões conhecidos. Mas, se quisermos determinar estes constituintes independentemente das variações de tempo de retenção, podemos usar índices de retenção, dentre os quais o índice de Kovats (KI) que faz uma relação entre o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Estes índices permitem uma melhor comparação dos dados entre diferentes laboratórios, aparelhos e análises, além de proporcionarem mais uma confirmação na identificação do composto (ADAMS, 1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) vem sendo empregada na avaliação qualitativa e quantitativa de óleos essenciais. Seu princípio é o mesmo da cromatografia a gás, diferenciando basicamente na fase móvel, onde na CG é um gás de arraste, e na CLAE é um líquido de alta pureza. Pode se utilizar diversas metodologias para promover a separação de compostos, como o sistema gradiente, onde se utiliza mais de uma bomba de arraste de fase móvel, ou isocrática, com apenas uma fase móvel. Neste tipo de cromatografia a amostra deve ser solúvel na fase móvel. Pode-se ainda utilizar tipos diferentes de colunas, como a de fase reversa, sistema de aquecimento por meio de forno. Enfim, este



equipamento requer grande habilidade do operador, pois possui grande versatilidade (MEYER, 1979).

A ressonância nuclear magnética (R.N.M.) também é uma técnica muito utilizada na elucidação estrutural de compostos orgânicos, e geralmente é aplicado para substâncias puras ou pela diluição dos óleos essenciais em clorofórmio deuterado. As amostras são analisadas com padrões de comparação, ou utilizando sistema de banco de dados de  $H^1$  e  $C^{13}$ , podendo-se identificar seus principais compostos (FORMACEK & KUBECZKA, 1982; CONSTANTIN, 2001). É interessante utilizar seus resultados paralelamente à análise por CG (BORDIGNON *et al.*, 1996; BORDIGNON *et al.*, 1997; BORDIGNON *et al.*, 1998).

Não podemos deixar de lembrar que, por ser um grupo de metabólitos que liberam um cheiro e sabor característico e particular de cada óleo, a análise sensorial, também chamada de ensaio organoléptico, é um procedimento muito importante e até hoje utilizado na indústria. É claro que pessoas com uma peculiar capacidade olfativa e degustativa são preparadas e aprimoram ainda mais este sentido, para identificação de diferentes óleos, e até mesmo de seus constituintes.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Geral

Promover o estudo sistemático de Piperáceas de ocorrência no Vale do Itajaí, em Santa Catarina, caracterizando o perfil químico e avaliando a atividade antimicrobiana de seus óleos essenciais.

#### 3.2 Específico

1. Promover o estudo da composição de óleo essencial das espécies *Piper caldense* C.DC., *Piper callosum*, *Piper lindbergi* C.DC. in DC., *Piper mollicomum* Kunth, *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum*, *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC. var. *regnellii* e *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) Yuncker.
2. Estabelecer o perfil químico qualitativo e quantitativo de seus óleos essenciais, empregando a técnica de espectro de massa e I.R. como parâmetro de identificação.
3. Determinar o índice de refração e densidade dos óleos essenciais isolados.
4. Identificar influência sazonal sobre o perfil químico dos óleos essenciais.
5. Realizar testes de atividade antimicrobiana “*in vitro*” com os óleos essenciais de Piperáceas.

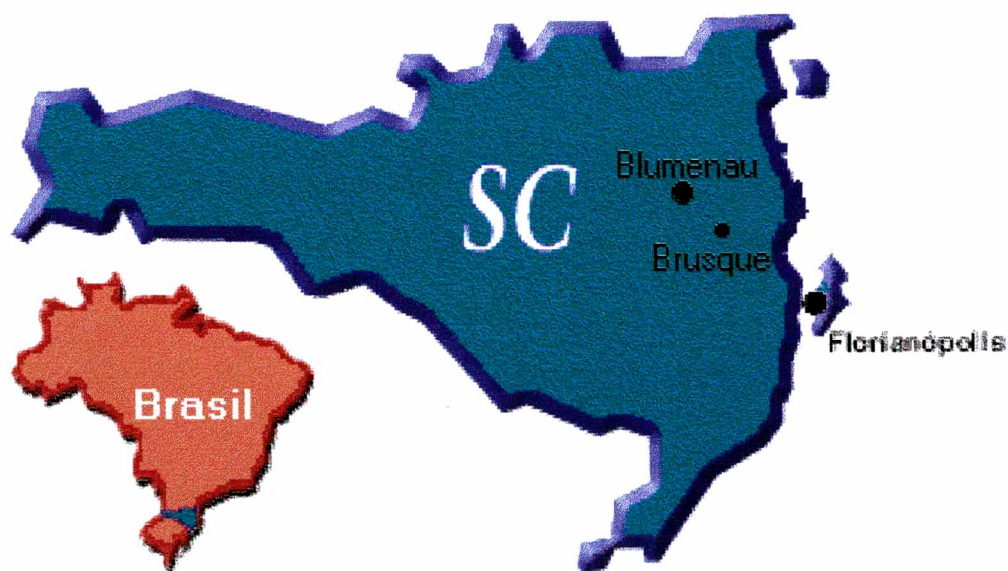
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho estão dentro dos padrões de pureza analítica e procedência (Merck<sup>®</sup>, Vetec<sup>®</sup>, Aldrich<sup>®</sup> e Carlo Erba<sup>®</sup>) recomendados, sem ter sido realizado qualquer purificação adicional.

### 4.2 Coleta e Classificação do Material Vegetal

As espécies da família *Piperaceae* em estudo foram coletadas entre abril de 1999 e fevereiro de 2001 em diferentes regiões do Vale do Itajaí, situado no estado de Santa Catarina (Figura 13). As figuras 14 e 15 mostram a localização geográfica dos municípios em que foram realizadas as coletas.



**Figura 13.** Localização geográfica do estado de Santa Catarina e municípios de Florianópolis e Blumenau.



As coletas foram realizadas em áreas da Mata Atlântica fazendo-se as mesmas no período matutino, horário em que o clima está fresco e a volatilidade do óleo essencial é menor, originando menor perda de óleo. Juntamente com as amostras para análise, coletou-se material vegetal para preparar a exsicata. Fotografias das espécies e do local de coleta foram tirados para auxiliar a identificação das espécies e facilitar o retorno ao local.

Após a coleta, preparação das exsicatas e demarcação do local onde as espécies foram coletadas, o material colhido para estudo foi levado para o laboratório onde as plantas foram limpas e separadas em partes (talos, folhas e infrutescência) e pesadas.

Parte das folhas foi colocada para secagem a temperatura ambiente, até que seu peso seco não se alterasse, para posterior extração do óleo essencial com planta seca. Outra parte foi armazenada em congelador para posterior extração do óleo essencial com planta fresca ou então, procedeu-se a extração de óleo essencial imediatamente após a coleta.

As exsicatas foram levadas ao Herbário da FURB para secagem, e, logo após a coleta foram enviadas aos botânicos para classificação.

As espécies *Piper caldense* C. DC., *Piper gaudichaudianum* Kunth e *Piper mollicomum* foram coletadas no Parque Municipal São Francisco de Assis em Blumenau; a *Piper callosum* e *Piper regnellii* var. *pallenscens* na Congregação das Irmãs Franciscanas em Rodeio, Estado de Santa Catarina; a *Piper lindbergii* C. DC. no Salto Weissbach em Blumenau; e a *Piper regnellii* (Miq) C. DC. no Campus I da FURB – Universidade Regional de Blumenau neste mesmo município, e nos municípios de Brusque e Timbó, ambos situados no estado de Santa Catarina.

O Parque Natural Municipal São Francisco de Assis em Blumenau possui vegetação de Floresta Ombrófila Tropical densa, apresentando áreas predominantemente de floresta primária e, em menor extensão, secundária (ABREU *et al.*, 2000).

A Congregação das Irmãs Franciscanas, situada no município de Rodeio é um local onde verifica-se a presença de espécies exóticas, nativas e esta área é delimitada por pastagem e mata secundária.

As coletas realizadas no Salto Weissbach, um bairro do município de Blumenau, foram feitas numa reserva particular de mata ciliar nativa, às margens do rio Itajaí.



Na tabela 01 relaciona-se as espécies, locais e data das coletas, além da verificação de existência ou não de infrutescência e inflorescência nas espécies.

**Tabela 01.** Coletas realizadas com as diferentes espécies do gênero *Piper*.

| Espécie Analisada                           | Local de Coleta          | Data     |                 | Infrutescência  | Inflorescência |
|---|--------------------------|----------|-----------------|-----------------|----------------|
|   |                          | Coleta   |                 |                 |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 10/04/99 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 10/04/99 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 15/05/99 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 15/05/99 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 29/01/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper caldense</i> C. DC.                | Parque São Francisco     | 29/01/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper callosum</i>                       | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 20/03/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper callosum</i>                       | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 12/12/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper callosum</i>                       | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 27/02/01 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper lindbergii</i> C. DC.              | Salto Weissbach          | 07/08/99 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper lindbergii</i> C. DC.              | Salto Weissbach          | 01/04/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper lindbergii</i> C. DC.              | Salto Weissbach          | 18/01/01 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallidum</i> | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 20/03/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Campus I - FURB          | 07/06/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Brusque (brejo)          | 28/06/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Campus I - FURB          | 19/08/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Est. Rest. Paromas       | 12/09/00 | <b>presente</b> | <b>presente</b> |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Campus I - FURB          | 07/12/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallidum</i> | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 12/12/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C. DC.         | Campus I - FURB          | 31/01/01 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallidum</i> | Congr. Ir. Franc. Rodeio | 14/02/01 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 11/03/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 01/04/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 13/05/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 06/06/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 09/12/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper mollicomum</i>                     | Parque São Francisco     | 24/03/01 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth          | Parque São Francisco     | 01/04/00 | <b>presente</b> | ausente         |                |
| <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth          | Parque São Francisco     | 13/05/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth          | Parque São Francisco     | 09/12/00 | ausente         | ausente         |                |
| <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth          | Parque São Francisco     | 31/01/01 | ausente         | ausente         |                |

O reconhecimento das espécies *Piper* foram efetuadas pelos Botânicos Marcos Sobral (UFRGS), Sandro Menezes Silva (UFPR/SCB) e Marília Borgo (UFPR). As exsiccatas das espécies encontram-se arquivadas nos Herbários do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e no Herbário de botânica da FURB, com os seguintes números de registro (tabela 02).



**Tabela 02.** Relação dos números de registro das espécies estudadas e seus respectivos herbários.

| Nome da espécie  | Número registro          |
|--|--------------------------|
| <i>Piper caldense</i> C.DC.                                    | 3839, 3840 (FURB)        |
| <i>Piper callosum</i>  | 3790, (FURB)             |
| <i>Piper lindbergii</i> C.DC. in DC                            | 3828 (FURB)              |
| <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallenscens</i> (C.DC.) Yuncker | 3787 (FURB) 40607 (UFPR) |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC.in DC, var <i>regnellii</i> | 3791 (FURB)              |
| <i>Piper mollicomum</i> Kunth                                  | 3797 (FURB)              |
| <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, var <i>gaudichaudianum</i> | 3841 (FURB)              |

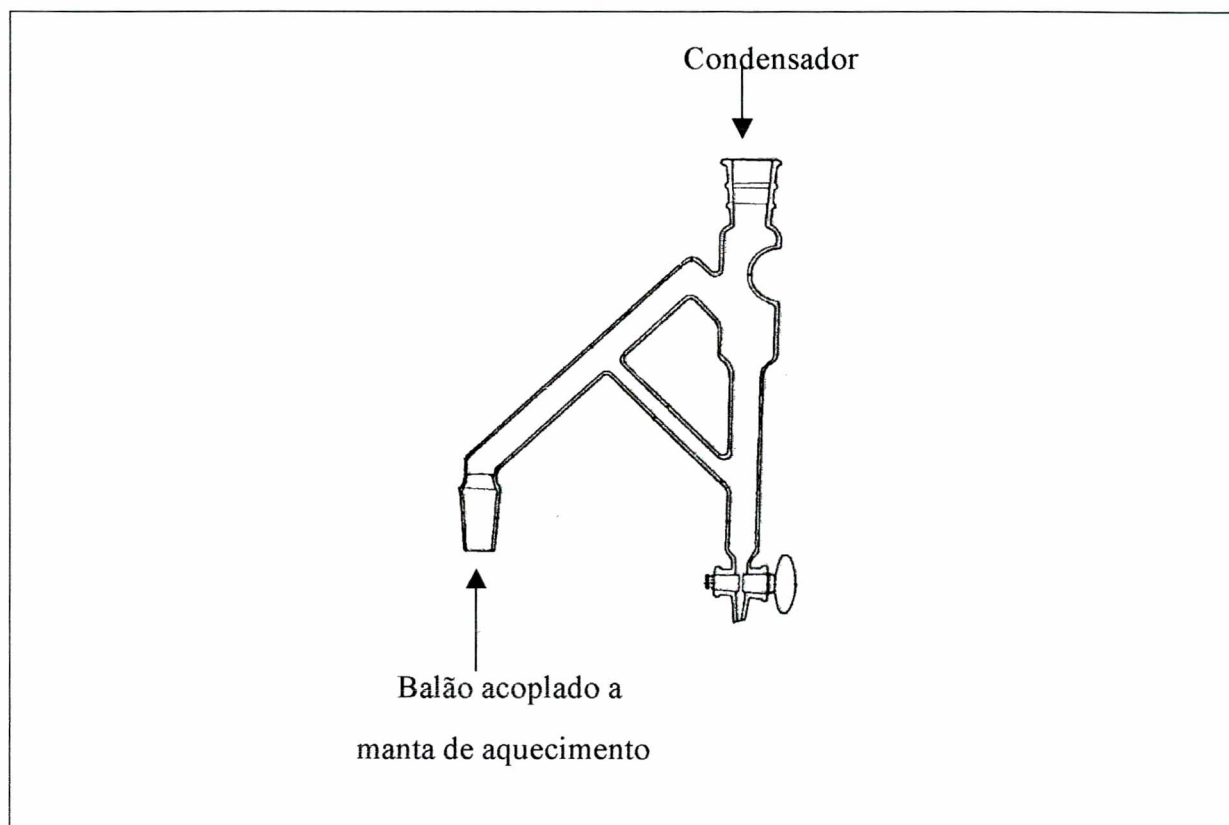
#### 4.3 Métodos de Extração e Purificação

Utilizou-se como método de separação de óleo essencial a destilação por arraste de vapor em aparelho de Clevenger modificado segundo Gottlieb & Magalhães (1960) como demonstrado na figura 16.

Este aparelho é conectado na sua parte inferior por um balão de fundo redondo, no qual este fica parcialmente preenchido pelo material a ser extraído (folhas rasuradas, talos cortados ou infrutescências), cobertas por água destilada e esta balão é alocado numa manta de aquecimento, para a promoção da evaporação das substâncias voláteis contidas no material vegetal.

Na porção superior do Clevenger, o mesmo é conectado por um condensador submetido a refrigeração através da passagem de água corrente, fazendo com que as substâncias extraídas no balão na forma de vapor, caso cheguem no condensador, estas sejam condensadas, retornando ao aparelho de Clevenger e não sejam perdidas pela sua saída ao ambiente externo. Ao retornar ao aparelho, a substância extraída, no caso o óleo essencial, fica retida no reservatório graduado e preenchido com água.

Depois de realizada a extração, o óleo essencial, juntamente com sua água aromática é removida do aparelho através da saída contendo uma torneira e este material é recebido numa proveta graduada.



**Figura 16.** Aparelho Clevenger modificado (Fonte: GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).

Quando o volume de óleo obtido era inferior a 1 mL, este foi isolado com o uso de solvente orgânico, no caso o n-hexano, sendo empregado sulfato de sódio anidro para a remoção de água residual. Posteriormente fez-se filtração gravimétrica e concentração da amostra em evaporador rotatório com temperatura do banho em aproximadamente 40°C, até a obtenção do óleo puro.

Para volumes superiores, empregou-se técnica clássica de separação de líquidos imiscíveis.

## **4.4 Métodos de Caracterização**

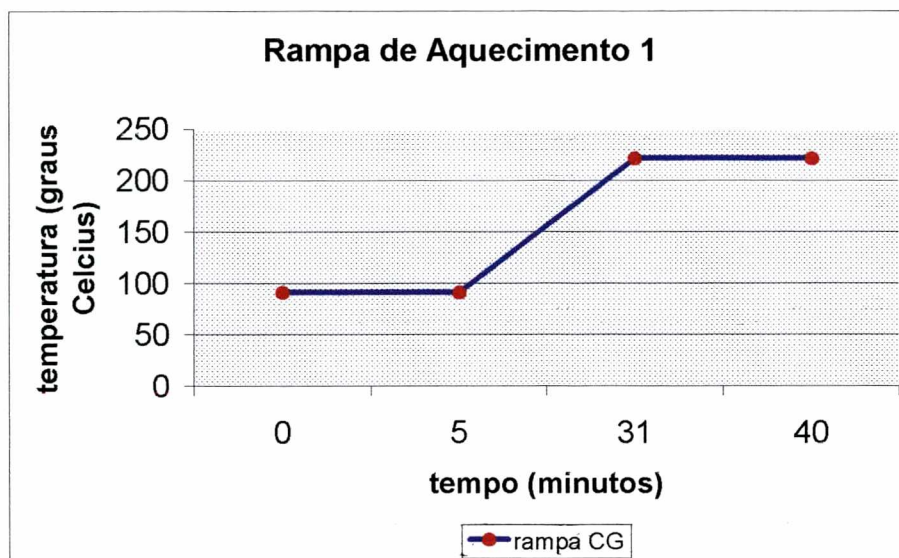
### **4.4.1 Análise Física**

O índice de refração foi determinado em aparelho modelo ABBE à temperatura ambiente. A densidade dos óleos foi obtida empregando-se a técnica do tubo capilar. Esta técnica consiste na determinação do volume e da massa do óleo neste mesmo tubo (CHILTON & PERRY, 1973).

Para as análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram utilizadas lâminas (2 X 7cm) revestidas com sílica gel com fluorescência (GF-254), sendo reveladas em câmara com radiação ultravioleta e posteriormente com iodo.

### **4.4.2 Cromatografia a Gás – CG**

A análise por Cromatografia a Gás foi conduzida em aparelho da marca Shimatzu<sup>®</sup> 14B, configurado com detector de ionização de chama e coluna capilar simplicity-1 de sílica fundida (30m de comprimento X 0,25mm de diâmetro interno) com 0,25 micra de espessura. A injeção da amostra foi realizada com divisão de fluxo em modo split 25:1. A temperatura do injetor e detector foram de 260 °C e 280 °C, respectivamente, e a rampa de aquecimento foi assim programada: de 90 °C – 150 °C (8 °C/min), de 150 °C – 200 °C (5°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos (AGUIAR *et al.*, 1999). A figura 17 mostra esta rampa de aquecimento.



**Figura 17.** Rampa de aquecimento 1 do cromatógrafo a gás modelo Shimadzu® 14B do IPT – FURB.

#### 4.4.3 Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa – CG/EM

As análises por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massa (CG/EM) foram realizadas empregando o modelo HP5890/5970, com coluna cromatográfica ligada contendo filme de metil-silicone HP-PONA® (50m de comprimento X 0,21mm de diâmetro interno) e 0,50 micra de espessura do filme (ABREU *et al.*, 2000). Utilizaram-se os seguintes padrões terpênicos e hidrocarbonetos para calibrar o equipamento (tabelas 03 e 04).

**Tabela 03.** Lista dos padrões puros de óleos essenciais utilizados na identificação de componentes no CG-EM da UFPR.

| Padrões de Óleos Essenciais |                         |
|-----------------------------|-------------------------|
| Alfa pineno                 | Limoneno                |
| Alloocimeno                 | Linalool                |
| Azuleno                     | Mentol                  |
| Beta pineno                 | Mirceno                 |
| Cânfora                     | Propionato de citronila |
| Cariofileno                 | S (-) beta citrionelol  |
| Citral                      | Safrol                  |
| D,L – nerolidol             | Terpineol               |
| Eugenol                     | Timol                   |
| Geraniol                    |                         |



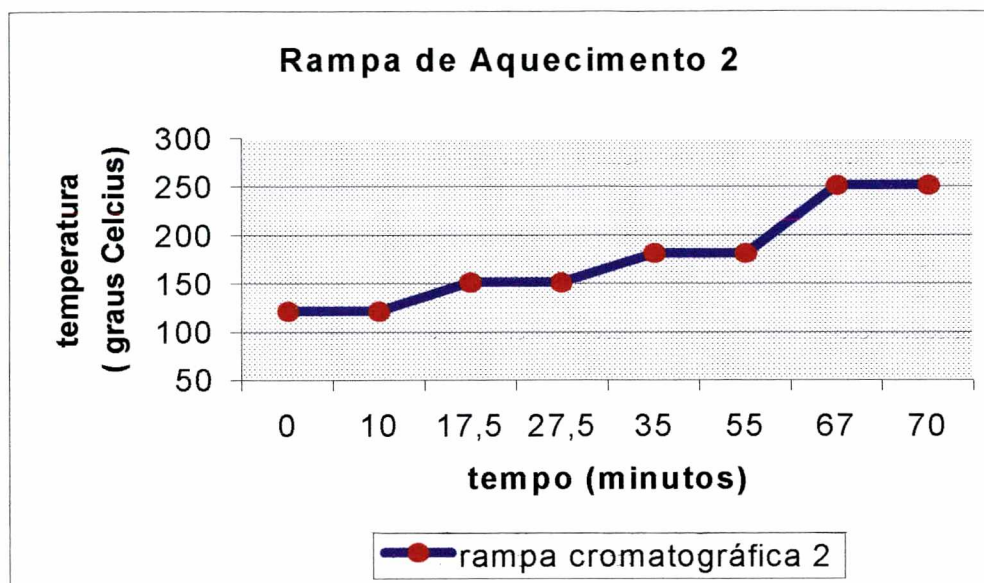
**Tabela 04.** Lista dos padrões puros de hidrocarbonetos utilizados na identificação de componentes no CG-EM da UFPR.

| Padrões de Hidrocarbonetos |                        |                           |
|----------------------------|------------------------|---------------------------|
| C8 – n-octano              | C21 – n-heneicosano    | C33 – n-tritriacontano    |
| C9 – n-nonano              | C22 – n-docosano       | C34 – n-tetratriacontano  |
| C10 – n-decano             | C23 – n-tricosano      | C35 – n-pentatriacontano  |
| C11 – n-undecano           | C24 – n-tetracosano    | C36 – n-hexatriacontano   |
| C12 – n-dodecano           | C25 – n-pentacosano    | C37 – n-heptatriacontano  |
| C13 – n-tridecano          | C26 – n-hexacosano     | C38 – n-octatriacontano   |
| C14 – n-tetradecano        | C27 – n-heptacosano    | C39 – n-nonatriacontano   |
| C15 – n-pentadecano        | C28 – n-octacosano     | C40 – n-tetracontano      |
| C16 – n-hexadecano         | C29 – n-nonacosano     | C41 – n-hentetracontano   |
| C17 – n-heptadecano        | C30 – n-triacontano    | C44 – n-tetratetracontano |
| C18 – n-octadecano         | C31 – n-hentriacontano | C46 – n-hexatetracontano  |
| C19 – n-nonadecano         | C32 – n-dotriacontano  | C50 – n-pentacontano      |
| C20 – n-eicosano           |                        | C60 – n-hexacontano       |

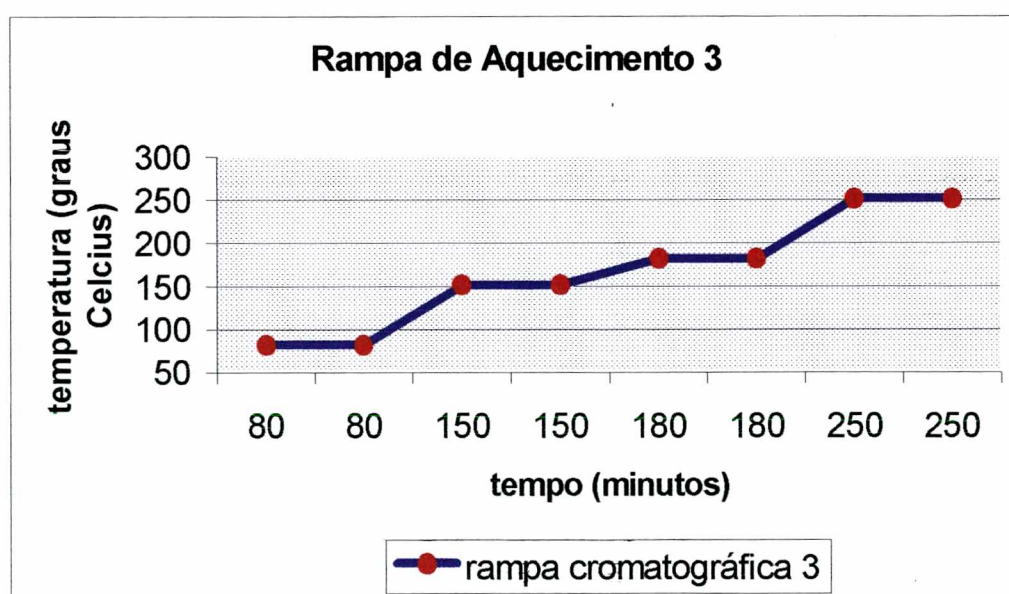
Três rampas de temperatura foram desenvolvidas para a análise dos óleos essenciais no CG-EM:

- Rampa de aquecimento 2: 120 °C por 10 minutos, de 120 °C – 150 °C (4° C/min), permanecendo por 10 minutos, de 150 °C – 180 °C (4° C/min), permanecendo por 20 minutos, e de 180 °C – 250 °C (6° C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos (Figura 18);
- Rampa de aquecimento 3: 80 °C por 10 minutos, de 80 °C – 150 °C (4° C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150 °C – 180 °C (4 °C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180 °C – 250 °C (6 °C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos (Figura 19);
- Rampa de aquecimento 4: 80 °C por 1 minuto, de 80 °C – 140 °C (12 °C/min) permanecendo por 10 minutos, de 140 °C – 160 °C (2 °C/min) permanecendo por 20 minutos e de 160 °C – 250 °C (3° C/min) permanecendo nesta temperatura por 10 minutos (Figura 20).

**Figura 18.** Rampa de aquecimento 2 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.

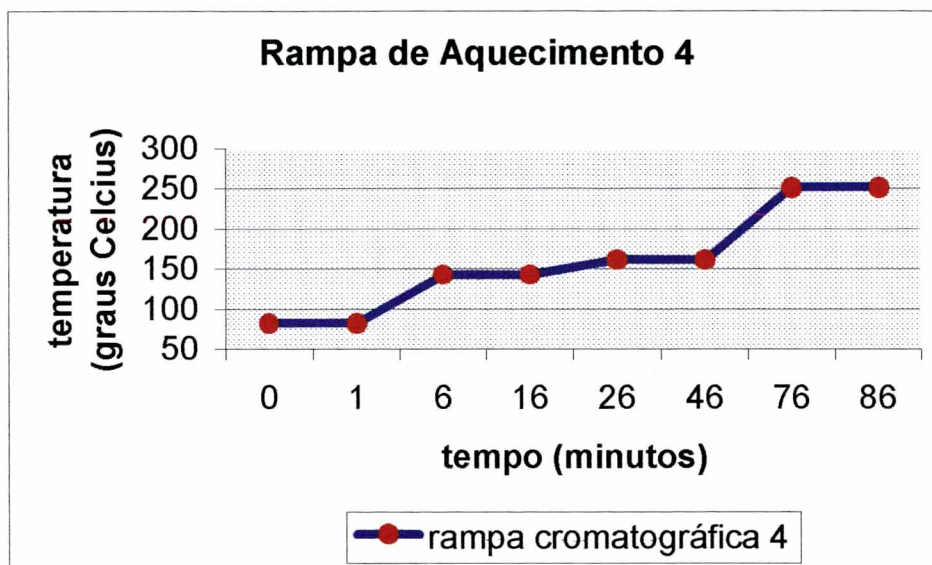


**Figura 19.** Rampa de aquecimento 3 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.





**Figura 20.** Rampa de aquecimento 4 do Cromatógrafo a Gás acoplada com Espectrômetro de Massa modelo HP5890/5970 da UFPR.



#### 4.4.4 Ressonância Nuclear Magnética

As análises de Ressonância Nuclear Magnética de  $C^{13}$  e  $H^1$  foram realizadas utilizando o modelo Varian® XL – 100 MHz para  $H^1$  e 25 MHz para  $C^{13}$ , em clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos expressos em valores de ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

#### 4.6 Análise Microbiológica

Foram utilizadas cepas puras de três espécies de microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Fez-se padronização das cepas utilizando suspensão para crescimento de cada microorganismo em caldo de cultura Müller-Hinton, à concentração de  $10^6$  UFC.  $mL^{-1}$  e incubadas em condições aeróbias.

#### 4.6.1 Teste de Difusão em Ágar

O teste de Difusão em Ágar foi realizado utilizando placas de Petri (13 x 100 mm) e adicionados 18 mL de ágar Müller-Hinton no mesmo. Após a solidificação do meio, foram feitos cinco poços de 7 mm de diâmetro para conter o material a ser testado.

A suspensão bacteriana foi inoculada na superfície do meio preparado anteriormente, com o auxílio de um “swab” de algodão. Os poços foram preenchidos com 50 µL de cada amostra de óleo essencial bruto. As placas foram incubadas a 36° C por 20 horas. O resultado positivo foi definido como uma zona de inibição de crescimento microbiano de, no mínimo 9 mm de diâmetro (ALVES *et al.*, 2000).

Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, foram padronizados os seguintes símbolos:

- (-) inativo, corresponde a zona de inibição de crescimento bacteriano menor que 9 mm;
- (+) parcialmente ativo - zona de inibição média entre 9 a 12 mm;
- (++) ativo - zona de inibição entre 13 a 18 mm;
- (+++ muito ativo - zona de inibição acima de 18 mm. (SMANIA *et al.*, 1995).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do aparelho de Clevenger modificado segundo Gottlieb & Magalhães (1960) em relação aos outros modelos proporcionou grande praticidade, pois permitiu a extração de óleos essenciais de diferentes densidades num mesmo aparelho sem necessitar prévia referência para saber qual modelo utilizar, além de não ser necessária a adição de água durante a extração e possuir recipiente graduado para conter o óleo extraído, facilitando os cálculos de concentração.

Notou-se também que a extração do óleo com solvente quando possível, deve ser evitada, pois, dependendo da pureza do solvente e do tipo de solvente, pode-se ocorrer interferência nos resultados das análises subseqüentes. Estas alterações podem ser desde uma modificação no tempo de retenção, como promover alterações químicas entre o solvente e os componentes do óleo essencial ocasionando inclusive modificações químicas ou até decomposição promovida pelo aquecimento para a remoção do solvente.

A seguir, serão abordados os resultados obtidos, sendo estes descritos separadamente, de acordo com a espécie estudada e posteriormente os ensaios microbiológicos serão apresentados.

### 5.1 *Piper caldense* C. DC.

Os ensaios de hidrodestilação das diferentes partes da espécie *Piper caldense* (folhas, caule, infrutescência) não forneceram óleo essencial (rendimento inferior a 0,1%). O grau de desidratação das folhas foi em torno de 87%, não sofrendo influência sazonal significativa (tabela 05). O cálculo de perda de água das folhas é feito para se fazer correção nos teores de óleo essencial existente nas folhas secas, obtendo assim, parâmetro comparativo destas com as folhas frescas da mesma coleta.

É importante ressaltar que nesta espécie, realizou-se mais de uma coleta no mesmo dia, em pontos diferentes do Parque. Assim, tem-se a amostra “a” e “b” descrito após a data da referida coleta.

**Tabela 05.** Grau de desidratação das folhas da *Piper caldense* C.DC. após secagem a temperatura ambiente.

| Data      | Perda         |
|-----------|---------------|
| Coleta    | Água (folhas) |
| 10/04/99a | 85.40%        |
| 10/04/99b | 78.90%        |
| 15/05/99a | 87,18%        |
| 15/05/99b | 88.91%        |
| 29/01/00a | 88.90%        |
| 29/01/00b | 88,59%        |

## 5.2 *Piper callosum*

A tabela 06 mostra o grau de desidratação das folhas da espécie *Piper callosum* que, apesar de ter sido feita poucas coletas para serem comparadas, observa-se que esta apresentou teor de perda de água menor que a *Piper caldense*. Uma causa provável para este fato deve-se à característica botânica da própria folha onde, na *Piper callosum* são mais grossas e firmes, aumentando o peso bruto de massa sólida das folhas da planta.

Na coleta de 12/12/00, devido a fatores climáticos da época de coleta, não foi possível se obter sua porcentagem de desidratação, pois a presença de fungos nas folhas durante a secagem danificou as amostras.

**Tabela 06.** Grau de desidratação das folhas da *Piper callosum* após secagem a temperatura ambiente.

| Data     | Perda         |
|----------|---------------|
| Coleta   | Água (folhas) |
| 20/03/00 | 66,21%        |
| 27/02/01 | 72,63%        |

Verificou-se que o teor de óleo essencial nas folhas da espécie *Piper callosum* foi considerável (tabela 07), variando entre 0,64% e 0,81% (folha fresca). Deve-se lembrar que esta oscilação ocorre, inclusive pelas coletas em diferentes épocas do ano, onde, obteve-se 0,64% de óleo na coleta que ocorreu em final de março de 2000 (início de outono), 0,74% em dezembro de 2000 e 0,88% em final de fevereiro de 2001. Lembrando ainda que, o verão de



2000/2001 foi extremamente seco e quente, fazendo com que parte da água evaporasse das folhas e concentrasse o óleo essencial na mesma (tabelas 06 e 07).

Na terceira coleta conseguiu-se coletar grande quantidade de frutos, possibilitando a extração de seu óleo, obtendo 0,88% (tabela 07). Verificou-se que quando cromatografados através de CCD os óleos apresentaram fluorescência no ultravioleta e manchas quando revelados com iodo, indicando a presença de ligações duplas alternadas, sendo confirmadas posteriormente por CG-EM pela presença de safrol (maior constituinte) dentre outros minoritários (tabelas 08, 09 e 10).

Os resultados de densidade e índice de refração apresentaram certa reprodutibilidade de resultados, exceto a densidade do óleo das folhas frescas que oscilou entre 1,0022 g/mL e 1,0554 g/mL (tabela 07).

É importante ressaltar que o aroma de seu óleo é tão evidente que, ao proceder uma rasura grosseira da planta, sentimos um cheiro forte e característico do seu óleo.

**Tabela 07.** Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie *Piper callosum*.

| Data Coleta | Parte Analisada | Rendimento Óleo | Fluorescência | Revelação Iodo | Densidade (g/mL) | Índice Refração |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|------------------|-----------------|
| 20/03/00    | folha fresca    | 0,64%           | presente      | presente       | 1,0554           | 1,5280          |
|             | folha seca      | 1,70%           | presente      | ausente        | 1,0496           | 1,5255          |
|             | fruto           | 0,00%           | <<<           | <<<            | <<<              | <<<             |
|             | caule fresco    | 0,04%           | <<<           | <<<            | <<<              | <<<             |
| 12/12/00    | folha fresca    | 0,74%           | presente      | presente       | 1,0344           | 1,5205          |
| 27/02/01    | folha fresca    | 0,81%           | presente      | presente       | 1,0022           | <<<             |
|             | frutos          | 0,88%           | presente      | presente       | 0,8563           | 1,4697          |

Nas tabelas 08 a 10 apresentamos os resultados de análises de CG-EM onde, na tabela 08 temos as folhas secas da coleta de 20/03/00, na tabela 9 as folhas frescas da mesma coleta e na tabela 10 as folhas frescas da coleta realizada em 12/12/00. Os componentes assinalados com asterisco foram usados como parâmetro para cálculo do índice de retenção e os assinalados em azul refere-se aos componentes comuns às diferentes análises realizadas com a mesma espécie.

Verificamos que nas 3 tabelas a variação da composição de óleo essencial e seus teores foi razoável, a não ser pela confirmação do metil eugenol que só ocorreu na coleta de 12/12/00 (tabela 10), mostrando a estabilidade da constituição do óleo essencial.

Os resultados obtidos com o CG-EM das folhas frescas da coleta de 12/12/00 da *Piper callosum* constam na tabela 10, sendo que, os principais constituintes deste óleo são: safrol (66,25%), metil eugenol (9,83%) e beta-pineno (5,65%). Foram utilizados como padrões para a determinação do índice de retenção neste óleo o alfa-pineno, safrol e beta-eudesmol. O principal princípio ativo existente no seu óleo essencial foi o safrol, que oscilou a concentração nas outras coletas entre 48 e 66% em área no cromatograma.

**Tabela 08.** Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie *Piper callosum* (coleta de 20/03/00).

| Composto                   | a<br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | b<br>TR (min) | c<br>% | d<br>IR Lit | e<br>IR Obs |
|----------------------------|-------------|-------------------------|---------------|--------|-------------|-------------|
| alfa pineno *              | 000080-56-8 | 96/96/96                | 18,45         | 0,43   | 939         | <           |
| sabineno                   | 003387-41-5 | 96/94/91                | 20,36         | 0,37   | 976         | 972         |
| (-) 2-beta pineno *        | 000127-91-3 | 92/91/91                | 20,83         | 2,12   | 980         | <           |
| mirreno *                  | 000123-35-3 | 95/94/94                | 21,02         | 0,34   | 991         | <           |
| alfa felandreno            | 001529-99-3 | 95/95/91                | 22,02         | 0,42   | 1005        | 1013        |
| alfa terpineno             |             | 97/94                   | 22,68         | 0,88   | 1018        | 1027        |
| para cimeno                | 000099-87-6 | 93                      | 22,83         | 0,85   | 1026        | 1030        |
| 1,8 cineol                 | 000470-82-6 | 95/95                   | 23,36         | 1,50   | 1033        | 1040        |
| gama terpineno             | 000099-85-4 | 93/90                   | 24,83         | 2,24   | 1062        | 1070        |
| cis sabineno hidrato       | 015826-82-1 | 97                      | 25,05         | 0,55   | 1068        | 1074        |
| terpinoleno (alfa)         | 000586-62-9 | 97/96/96                | 26,27         | 0,97   |             | 1096        |
| linalol *                  | 000078-70-6 | 94/58                   | 26,36         | 1,59   | 1098        | <           |
| safrol                     | 000094-59-7 | 99/99/99                | 39,78         | 48,26  | 1285        | 1284        |
| alfa copaeno               | 003856-25-5 | 99/99/99                | 47,94         | 1,48   | 1376        | 1368        |
| beta cubebeno              | 013744-15-5 | 97                      | 48,86         | 0,89   | 1390        | 1376        |
| trans cariofileno (beta) * | 000087-44-5 | 99/99/99                | 51,94         | 1,45   | 1404        | <           |
| alfa humuleno              | 006753-98-6 | 98/97/97                | 54,39         | 0,55   | 1454        | 1446        |
| alfa amorfeno              | 023515-88-0 | 98/98/98                | 55,71         | 1,55   |             | 1468        |
| germacreno-D               | 023986-74-5 | 91                      | 56,36         | 1,97   | 1480        | 1479        |
| alfa muuroleno             | 031983-22-9 | 96/95                   | 57,27         | 1,36   | 1499        | 1493        |
| delta cadineno             | 000483-76-1 | 80                      | 58,65         | 1,48   | 1524        | 1515        |
| elemol *                   | 000639-99-6 | 96/91/91                | 60,86         | 1,11   | 1549        | <           |
| delta cadinol              |             | 95                      | 70,09         | 2,56   | 1376        | 1639        |
| beta eudesmol              | 000473-15-4 | 91/64/62                | 71,2          | 2,58   | 1649        | 1649        |
| alfa eudesmol *            | 000473-16-5 | 99                      | 71,55         | 0,68   | 1652        | <           |
|                            |             |                         | Total(%)      | 78,18  |             |             |

Programação rampa de aquecimento 02 - 120° C por 10 minutos, de 120° C - 150° C (4° C/min), permanecendo por 10 minutos, de 150° C - 180° C (4° C/min), permanecendo por 20 minutos, e de 180° C - 250° C (6° C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. - índice de retenção observado.

**Tabela 09.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper callosum* (coleta de 20/03/00).

| Composto                   | <sup>a</sup><br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | <sup>b</sup><br>TR (min) | <sup>c</sup><br>% | <sup>d</sup><br>IR Lit. | <sup>e</sup><br>IR Obs. |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| alfa pineno *              | 000080-56-8            | 96/96/96                | 18,45                    | 0,48              | 939                     | <                       |
| beta pineno                | 000127-91-3            | 93                      | 20,72                    | 0,83              | 980                     | 991                     |
| alfa terpineno             | 000099-86-5            | 98/98                   | 22,66                    | 0,20              | 1018                    | 1031                    |
| 1,8 cineol                 | 000470-82-6            | 98/96/96                | 23,30                    | 0,73              | 1033                    | 1043                    |
| gama terpineno             | 000099-85-4            | 95/90                   | 24,72                    | 1,34              | 1062                    | 1070                    |
| terpinoleno (alfa)         | 000586-62-9            | 98/98/98                | 26,24                    | 0,49              |                         | 1096                    |
| linalol *                  | 000078-70-6            | 94/91/90                | 26,33                    | 1,49              | 1098                    | <                       |
| safrol                     | 000094-59-7            | 99/97/95                | 39,11                    | 59,63             | 1285                    | 1277                    |
| alfa copaeno               | 003856-25-5            | 99/99/99                | 47,69                    | 1,64              | 1376                    | 1366                    |
| trans cariofileno (beta) * | 000087-44-5            | 99/99/99                | 51,82                    | 2,08              | 1404                    | <                       |
| alfa humuleno              | 006753-98-6            | 98/97/97                | 54,30                    | 0,71              | 1454                    | 1447                    |
| alfa amorfeno              | 023515-88-0            | 98/98                   | 55,62                    | 1,78              |                         | 1469                    |
| germacreno D               | 023986-74-5            | 90/87                   | 56,27                    | 3,29              | 1480                    | 1479                    |
| gama cadineno              | 039029-41-9            | 70                      | 56,97                    | 0,51              | 1513                    | 1491                    |
| alfa muuroleno             |                        |                         | 57,20                    | 1,58              | 1499                    | 1494                    |
| delta cadineno             | 000483-76-1            | 86                      | 58,50                    | 0,93              | 1524                    | 1515                    |
| elemol *                   | 000639-99-6            | 97/93                   | 60,71                    | 1,18              | 1549                    | <                       |
| torreiol                   | 019435-97-3            | 95                      | 69,96                    | 2,97              | 1645                    | 1638                    |
| beta eudesmol              | 000473-15-4            | 92/87                   | 71,06                    | 3,30              | 1649                    | 1648                    |
| alfa eudesmol *            | 000473-16-5            | 90                      | 71,48                    | 1,04              | 1652                    | <                       |
|                            |                        |                         | Total(%)                 | 86,20             |                         |                         |

Programação rampa de aquecimento 02 - 120° C por 10 minutos, de 120° C - 150° C (4° C/min), permanecendo por 10 minutos, de 150° C - 180° C (4° C/min), permanecendo por 20 minutos, e de 180° C - 250° C (6° C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. - Índice de Retenção observado.

Ao realizar análise comparativa dos resultados obtidos em relação à constituição química do óleo essencial da espécie *Piper callosum* (tabelas 08, 09 e 10), nota-se a existência de uma faixa de similaridade entre seus óleos de 70 a 80%, sendo 71% nas folhas secas da coleta de 20/03/00, 76% nas folhas frescas da mesma coleta e 83% nas folhas frescas da coleta de 12/12/00. Este fato é evidenciado pelos componentes assinalados em azul nas respectivas tabelas. Devemos lembrar também de que nestas análises estamos comparando resultados de diferentes coletas e de extrações com folhas secas e frescas.

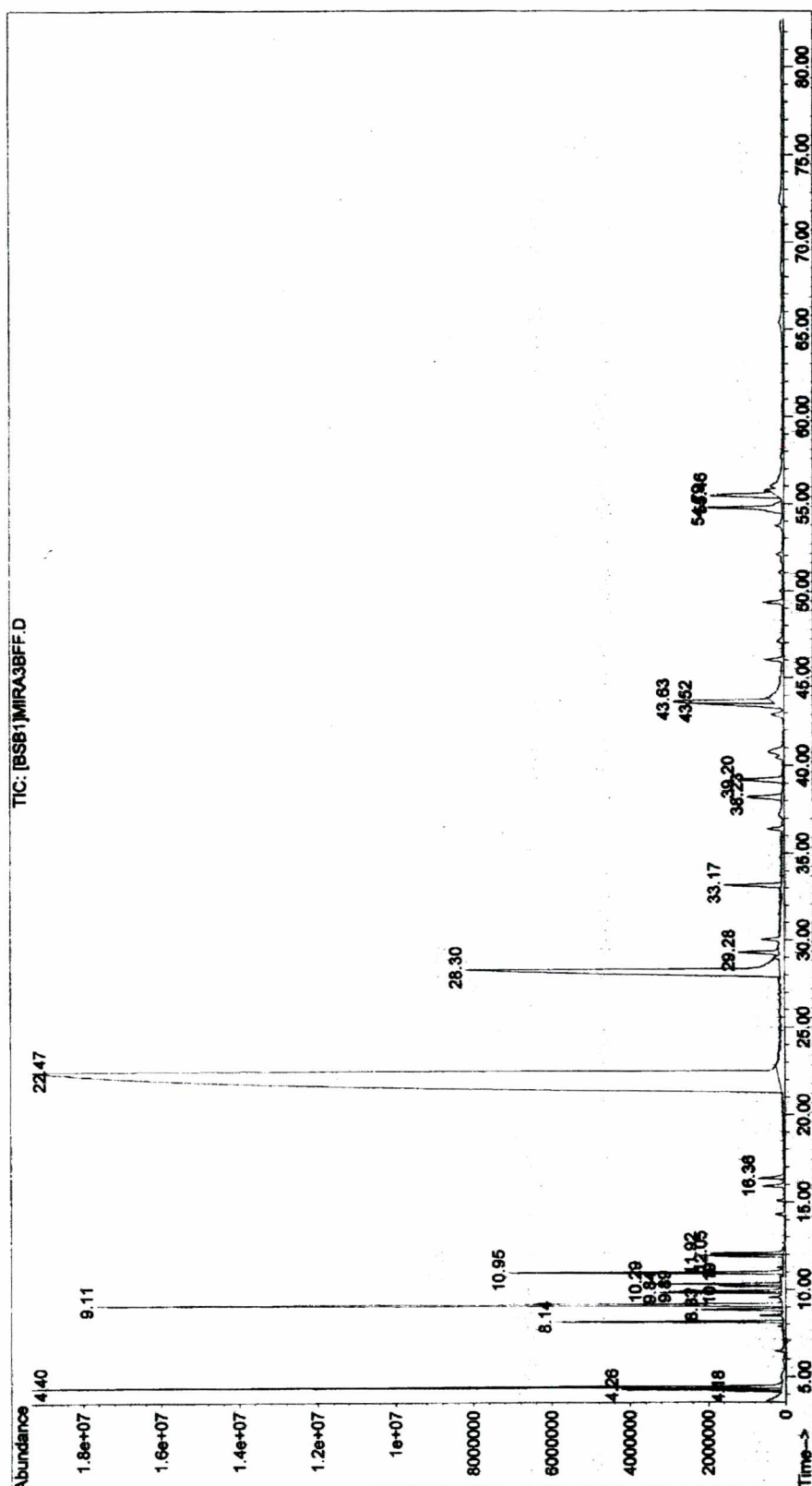


**Tabela 10.** Constituição química do óleo essencial folhas frescas da espécie *Piper callosum* (coleta de 12/12/00).

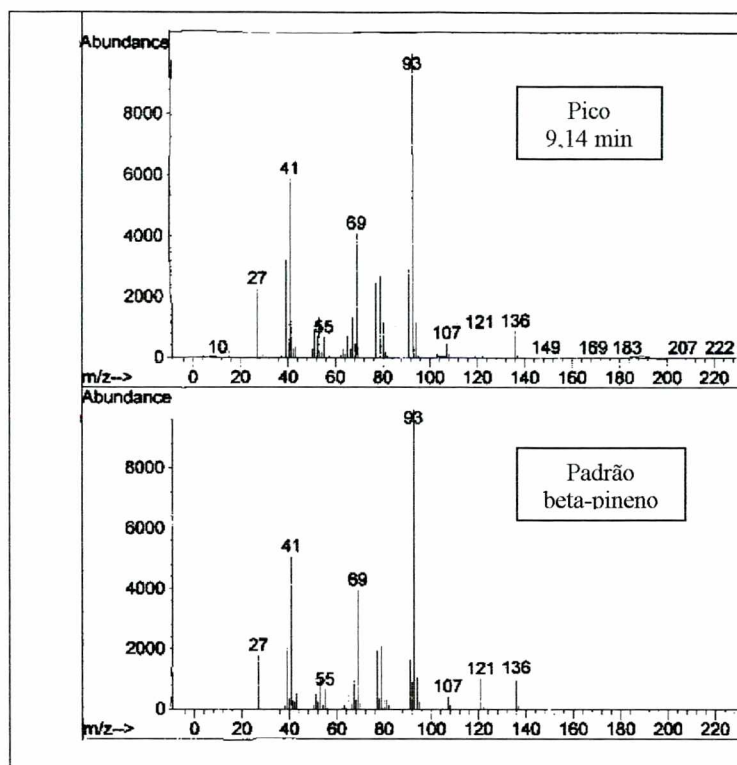
| Composto                 | <sup>a</sup><br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | <sup>b</sup><br>TR (min) | <sup>c</sup><br>% | <sup>d</sup><br>IR Lit. | <sup>e</sup><br>IR Obs. |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| alfa pineno *            | 80-56-8                | 97/97/97                | 8,14                     | 1,44              | 939                     | <                       |
| sabineno                 | 3387-41-5              | 87                      | 8,84                     | 0,77              | 976                     | 967                     |
| beta pineno              | 127-91-3               | 97/97/97                | 9,11                     | 5,65              | 980                     | 977                     |
| alfa terpineno           | 99-86-5                | 97/96/95                | 9,84                     | 0,88              | 1018                    | 1004                    |
| para cimeno              | 99-87-6                | 94/93                   | 9,89                     | 0,75              | 1026                    | 1005                    |
| limoneno                 | 138-86-3               | 94                      | 10,20                    | 0,43              | 1031                    | 1016                    |
| eucaliptol / 1,8 cineol  | 470-82-6               | 95/95/95                | 10,29                    | 1,06              | 1033                    | 1019                    |
| gamma terpineno          | 99-85-4                | 96/95/95                | 10,95                    | 2,31              | 1062                    | 1040                    |
| linalol                  | 78-70-6                | 90/86                   | 11,91                    | 0,69              | 1098                    | 1069                    |
| alfa terpinoleno         | 586-62-9               | 97/97/97                | 12,05                    | 0,68              | 1088                    | 1073                    |
| alfa terpineol           | 10482-56-1             | 86                      | 16,36                    | 0,37              | 1179                    | 1177                    |
| safrol *                 | 94-59-7                | 99/98/98                | 22,47                    | 66,25             | 1285                    | <                       |
| metil eugenol            | 93-15-2                | 98/97/97                | 28,29                    | 9,83              | 1401                    | 1378                    |
| alfa cubebeno            | 17699-14-8             | 93/91                   | 29,28                    | 0,59              | 1351                    | 1391                    |
| trans cariofileno (beta) | 87-44-5                | 98/98/98                | 33,18                    | 0,87              | 1418                    | 1442                    |
| alfa amorfeno            | 23515-88-0             | 99/95                   | 38,23                    | 0,67              | 1469                    | 1499                    |
| germacreno-D             | 23986-74-5             | 99/98/97                | 39,20                    | 0,87              | 1480                    | 1509                    |
| elemicina                | 487-11-6               | 98/98                   | 43,58                    | 2,96              | 1554                    | 1552                    |
| torreiol                 | 19435-97-3             |                         | 54,78                    | 1,56              | 1645                    | 1644                    |
| beta eudesmol *          | 473-15-4               | 90/74                   | 55,46                    | 1,34              | 1649                    | <                       |
|                          |                        |                         | Total (%)                | 99,97             |                         |                         |

Programação rampa de aquecimento 04 – 80 °C por 1 minuto, de 80° C – 140 °C (12 °C/min) permanecendo por 10 minutos, de 140 °C – 160 °C (2 °C/min) permanecendo por 20 minutos e de 160 °C – 250 °C (3 °C/min), permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. - Índice de Retenção observado.

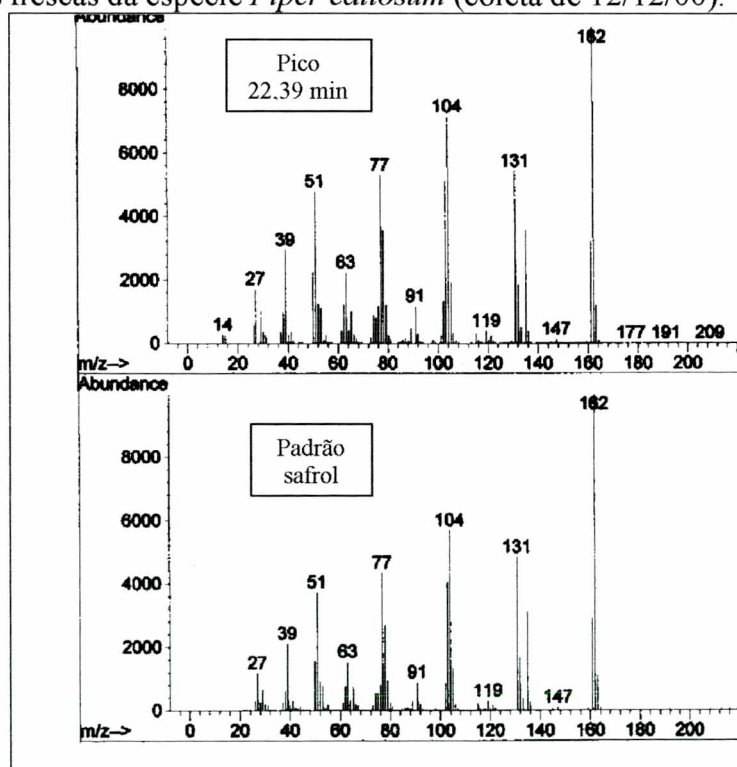
A figura 21 mostra o cromatograma de massa realizado das folhas frescas do óleo essencial da coleta de 12/12/00 e as figuras 22 e 23 mostram o espectro comparativo do safrol e beta-pineno com os respectivos espectros obtidos pela biblioteca do sistema de dados do CG-EM.



**Figura 21.** Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie *Piper callosum* (coleta de 12/12/00), rampa 04 e injeção de 0,4  $\mu$ L da amostra.



**Figura 22.** Espectro comparativo massa do beta-pineno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper callosum* (coleta de 12/12/00).



**Figura 23.** Espectro comparativo de massa do safrol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper callosum* (coleta de 12/12/00).

### 5.3 *Piper lindbergii* C.DC. in DC.

A tabela 11 mostra o grau de desidratação das folhas da espécie *Piper lindbergii* C.DC. in DC indicando certa variação no seu resultado devido a época do ano em que foram feitas as coletas, sendo a coleta de 07/08/99 (inverno) e a coleta 01/04/00, início de outono (tabela 03).

Na coleta de 18/01/01, conseguiu-se pouco material vegetal devido a uma devastação na mata, justamente onde estava esta espécie, impossibilitando a continuação dos estudos. Assim, pode-se verificar somente o rendimento é óleo bruto das folhas frescas desta coleta, já que a amostra utilizada para verificar a porcentagem de desidratação foi perdida por apresentar fungos.

**Tabela 11.** Grau de desidratação das folhas da *Piper lindbergii* C.DC. in DC. após secagem à temperatura ambiente.

| Data     | Perda         |
|----------|---------------|
| Coleta   | Água (folhas) |
| 07/08/99 | 73,69%        |
| 01/04/00 | 82,80%        |

Apesar da impossibilidade de se realizar novas coletas da espécie, pode-se verificar na tabela 12 resultados obtidos com as coletas já realizadas com a espécie *Piper lindbergii*.

A análise do óleo através de CCD mostrou a presença de fluorescência no ultravioleta e apresentaram manchas marrons quando reveladas com iodo, indicando a presença de ligações duplas alternadas.

O teor de óleo essencial não variou para as duas coletas. O óleo obtido através da coleta de 01/04/00 foi submetido à análise por CG-EM (tabela 13), porém o cromatograma (figura 24) tornou-se extremamente duvidoso, dificultando a elucidação e a confirmação da composição de seu óleo essencial. A quantidade de óleo obtido não permitiu a determinação da densidade do mesmo.



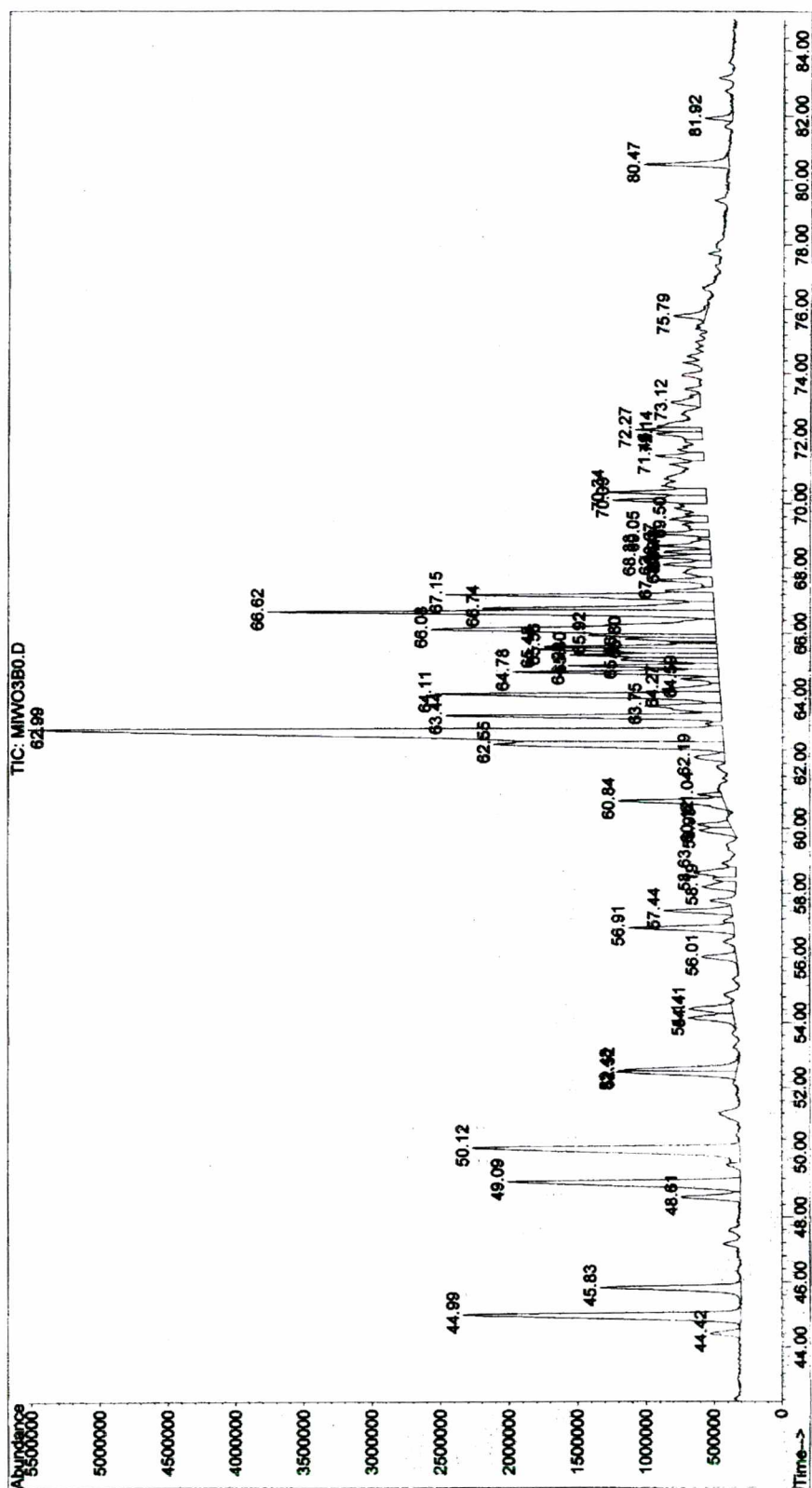
**Tabela 12.** Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie *Piper lindbergii* C.DC. in DC.

| Data Coleta | Parte Analisada | Rendimento Óleo | Fluorescência | Revelação Iodo | Índice Refração |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|
| 07/08/99    | folha fresca    | 0,05%           | presente      | <<<            | <<<             |
|             | folha seca      | 0,30%           | presente      | <<<            | <<<             |
|             | caule fresco    | 0,03%           | <<<           | <<<            | <<<             |
| 01/04/00    | folha fresca    | 0,05%           | presente      | presente       | 1,4985          |
|             | folha seca      | 0,42%           | presente      | presente       | 1,4975          |
|             | caule fresco    | 0,02%           | <<<           | <<<            | <<<             |
| 18/01/01    | folha fresca    | 0,33%           | <<<           | <<<            | <<<             |

**Tabela 13.** Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie *Piper lindbergii* (coleta de 01/04/00).

| Composto                 | <sup>a</sup> C.A.S. | grau de similaridade | <sup>b</sup> TR (min) | <sup>c</sup> % | <sup>d</sup> IR Lit. |
|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| beta pineno              | 127-91-3            | 97/97/96             | 15,54                 | 0,31           | 980                  |
| beta mirceno             | 123-35-3            | 95/94/94             | 15,65                 | 0,30           | 991                  |
| alfa copaeno             | 3856-25-5           | 99/99/99             | 44,98                 | 4,13           | 1376                 |
| beta elemeno             | 515-13-9            | 99/96/91             | 45,83                 | 1,83           | 1391                 |
| trans (beta) cariofileno | 87-44-5             | 99/99/99             | 49,08                 | 3,66           | 1418                 |
| trans alfa               | 13474-59-4          | 91/91                | 50,12                 | 4,65           |                      |
| beta santaleno           | 511-59-1            | 93/91/87             | 51,19                 | 0,44           | 1462                 |
| ar - curcumeno           | 644-30-4            | 99/96/95             | 54,13                 | 0,91           | 1483                 |
| alfa muuroleno           | 31983-22-9          | 99/98/97             | 56,91                 | 1,49           | 1499                 |
| beta bisaboleno          | 495-61-4            | 98/98/96             | 57,45                 | 0,99           | 1509                 |
| alfa amorfeno            | 23515-88-0          | 97/95                | 58,18                 | 0,62           |                      |
| calameneno               | 483-77-2            | 97/97/95             | 58,44                 | 0,24           | 1521                 |
| alfa calacoreno          | 21391-99-1          | 98/72                | 59,93                 | 0,50           | 1542                 |
| nerolidol                | 142-50-7            | 91/90                | 61,04                 | 0,28           |                      |
| alfa cariofileno         | 4586-22-5           | 58                   | 62,18                 | 0,47           | 1568                 |
| cariofileno óxido        | 1139-30-6           | 96/95/95             | 62,77                 | 18,95          | 1581                 |
| viridiflorol             | 552-02-3            | 99/99/99             | 63,44                 | 2,85           | 1590                 |
| alfa cedrol              | 77-53-2             | 60/55                | 64,58                 | 0,37           | 1596                 |
| torreiol                 | 19435-97-3          | 95                   | 65,56                 | 1,33           | 1645                 |
| aromadendreno            | 85710-39-0          | 45/42                | 65,92                 | 0,97           |                      |
| vulgarol B               | 11056-03-4          | 84                   | 66,74                 | 2,47           |                      |
| alfa bisabolol           | 72691-24-8          | 90/90                | 67,15                 | 2,93           | 1683                 |
| gama cis                 | 108187-11-2         | 70                   | 67,86                 | 0,57           |                      |
| iso (gama) cariofileno   | 118-65-0            | 64/64                | 68,09                 | 0,62           |                      |
| valerenol                | 84249-42-3          | 94/94                | 68,32                 | 0,72           |                      |
| epiglobulol              | 552-02-3            | 78                   | 69,06                 | 0,81           | 1590                 |
| beta oplopenona          | 28305-60-4          | 92                   | 70,34                 | 1,14           | 1606                 |
| ledano                   | 28580-43-0          | 64                   | 73,12                 | 0,54           |                      |
| fitol                    | 150-86-7            | 76                   | 81,92                 | 0,29           | 1949                 |
|                          |                     |                      | Total(%)              | 55,38          |                      |

Programação rampa de aquecimento 03 – 80°C por 10 minutos, de 80°C - 150°C (4°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150°C – 180°C (4°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180°C – 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).



**Figura 24.** Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie *Piper lindbergii* (coleta de 01/04/00), rampa 03 e injeção de 0,2 µl de amostra.

#### 5.4 *Piper regnellii*

Duas variedades de espécies de *Piper regnellii* foram estudadas, sendo as coletas de 20/03/00, 12/12/00 e 14/02/01 referentes à variedade *Piper regnellii* var. *pallescens*, coletada no município de Rodeio e as coletas de 07/06/00, 28/06/00, 19/08/00, 07/12/00 e 31/01/01 são da variedade *Piper regnellii* (Miq.) C.DC., diferindo de acordo com o local de coleta, onde e a coleta de 28/06/00 foi realizada no município de Brusque e as demais foram no campus I da FURB.

A tabela 14 mostra o grau de desidratação das folhas das espécies de *Piper regnellii* estudadas, sendo que seus resultados oscilaram entre 75% e 81%.

**Tabela 14.** Grau de desidratação das folhas da *Piper regnellii* após secagem à temperatura ambiente.

| Data<br>Coleta | Perda<br>Água (folhas) |
|----------------|------------------------|
| 07/06/00       | 78,75%                 |
| 28/06/00       | 80,94%                 |
| 19/08/00       | 75,51%                 |
| 07/12/00       | 79,44%                 |
| 12/12/00       | 76,22%                 |
| 31/01/01       | 80,35%                 |
| 14/02/01       | 75,29%                 |

A tabela 15 apresenta resultados obtidos com as espécies estudadas de *Piper regnellii*. Analisando o teor de óleo essencial nas folhas frescas, podemos verificar que na variedade *pallescens* o valor variou entre 0,41% e 0,57% e na variedade (Miq.) C.DC. ocorreu maior variação, de 0,18% (coletada em Brusque) a 0,45%.

Após cromatografia por CCD, verificou-se fluorescência quando as placas eram expostas à luz U.V. e manchas marrons quando reveladas com iodo indicando a presença de ligações duplas alternadas entre os constituintes do óleo.

Já a densidade dos óleos revelou grande variação entre as duas variedades, onde a variedade (Miq.) C.DC. apresentando como resultado de 0,8539 a 0,9233 g/mL e na variedade



*pallescens* cerca de 1,1100 g/mL. Nota-se que a diferença entre as densidades das duas variedades teve grande variação, onde a primeira é menos densa e a segunda é mais densa que a água, diferenciando sua posição no aparelho de Clevenger (tabela 15).

A análise de índice de refração das espécies revelou pouca variação nos seus resultados, oscilando entre 1,4776 e 1,5259 (tabela 15).

**Tabela 15.** Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie *Piper regnellii*.

| Data Coleta | Parte Analisada | Rendimento Óleo | Fluorescência | Revelação Iodo | Dens. (g/mL) | Índice Refração |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|-----------------|
| 3/20/2000   | folha fresca    | 0,41%           | ausente       | presente       | <<<          | 1,5247          |
| 6/7/2000    | folha fresca    | 0,45%           | presente      | presente       | 0,8600       | 1,4821          |
|             | folha seca      | 0,47%           | presente      | presente       | <<<          | 1,4990          |
|             | fruto           | 0,01%           | <<<           | <<<            | <<<          | <<<             |
|             | caule fresco    | 0,02%           | presente      | presente       | <<<          | 1,4888          |
| 6/28/2000   | folha fresca    | 0,18%           | <<<           | <<<            | 0,9233       | 1,5038          |
|             | folha seca      | 0,53%           | <<<           | <<<            | <<<          | <<<             |
| 8/19/2000   | folha fresca    | 0,20%           | <<<           | <<<            | 0,8539       | 1,4776          |
|             | caule fresco    | 0,00%           | <<<           | <<<            | <<<          | <<<             |
| 12/7/2000   | folha fresca    | 0,20%           | presente      | presente       | 0,8597       | 1,4808          |
| 12/12/2000  | folha fresca    | 0,51%           | <<<           | <<<            | 1,1133       | 1,5234          |
| 2/14/2001   | folha fresca    | 0,57%           | presente      | presente       | 1,1105       | 1,5259          |

#### 5.4.1 *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC) Yuncker

Nas tabelas 16 e 17 relacionamos os componentes identificados por CG-EM da *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) das coletas de 20/03/00 e 12/12/00.

Os resultados obtidos com o CG-EM das folhas frescas destas coletas apresentaram três componentes principais: dilapiol, beta-eudesmol e apiol, que oscilaram entre: dilapiol (20 e 18%), beta-eudesmol (6%) e apiol (51 e 54%). Nota-se que a concentração e composição destes componentes variou pouco, mesmo em épocas diferentes do ano. Foram utilizados como padrões para a determinação do índice de retenção no óleo da coleta de 12/12/00, o alfa-pineno, beta-cariofileno, elemol, dilapiol e apiol.

**Tabela 16.** Constituição química das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC) Yuncker (coleta de 20/03/00).

| Composto                 | a<br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | b<br>TR (min) | c<br>% | d<br>IR Lit. |
|--------------------------|-------------|-------------------------|---------------|--------|--------------|
| alfa pineno              | 80-56-8     | 96/96/96                | 9,62          | 0,07   | 939          |
| 1,8 cineol               | 470-82-6    | 90/86/70                | 12,94         | 0,07   | 1033         |
| bicicloelemeno           |             | 98                      | 30,57         | 0,35   |              |
| alfa cubebeno            | 17699-14-8  | 99/99/98                | 31,52         | 0,44   | 1351         |
| alfa copaeno             | 3856-25-5   | 98/96/96                | 33,43         | 0,13   | 1376         |
| beta (trans) cariofileno | 87-44-5     | 99/99                   | 36,13         | 0,92   | 1404         |
| aromadendreno            | 489-39-4    | 99/99/99                | 37,37         | 0,38   | 1439         |
| alfa humuleno            | 6753-98-6   | 97                      | 38,17         | 0,27   | 1454         |
| alloaromadendren         | 25246-27-9  | 98/98/97                | 38,68         | 0,18   | 1461         |
| alfa amorfeno            | 23515-88-0  | 99/99/99                | 39,32         | 1,89   |              |
| germacreno D             | 23986-74-5  | 98                      | 39,84         | 0,1    | 1480         |
| miristicina              | 607-91-0    | 99/99                   | 40,52         | 1,21   | 1520         |
| biciclogermacreno        | 24703-35-3  | 98/98/90                | 40,97         | 1,86   | 1494         |
| elemicina                | 487-11-6    | 99/97/95                | 42,13         | 1,49   | 1554         |
| cadineno                 |             | 97                      | 42,41         | 1,73   |              |
| nerolidol                | 7212-44-4   | 91/91                   | 44,61         | 1,67   |              |
| espatulenol              | 6750-60-3   | 99/99/96                | 46,83         | 1,26   | 1576         |
| cariofileno oxido        | 1139-30-6   | 93/86                   | 47,46         | 0,12   | 1581         |
| globulol                 | 489-41-8    | 99/99/98                | 47,76         | 0,59   | 1583         |
| dilapiol                 | 17672-89-8  | 95                      | 49,71         | 19,74  |              |
| torreiol                 | 19435-97-3  | 97                      | 52,86         | 1,52   | 1645         |
| beta eudesmol            | 473-15-4    | 76/58/49                | 54,34         | 6,41   | 1649         |
| apiol                    | 523-80-8    | 99/99/98                | 55,47         | 50,58  | 1680         |
|                          |             |                         | Total(%)      | 92,98  |              |

Programação rampa de aquecimento 02 - 120°C por 10 minutos, de 120°C - 150°C (4°C/min), permanecendo por 10 minutos, de 150°C - 180°C (4°C/min), permanecendo por 20 minutos, e de 180°C - 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto;; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).

Os compostos da tabela 17, assinalados em asterisco foram usados como padrão para a determinação do índice de retenção. Nota-se que vários picos não foram identificados por CG-EM, mas a soma destes representa 4,66% de constituintes.

Observa-se grande interesse neste óleo, pois, como já foi comentado em relação às pesquisas realizadas com esta espécie, nada foi encontrado de apiol e dilapiol no óleo essencial, sendo estes os únicos constituintes das plântulas desta espécie, e só depois que crescem é que as raízes passam a acumular neolignanais (CONSTANTIN *et al.*, 2001). Segundo THE MERCK INDEX (1996), o apiol e dilapiol possuem atividade sinérgica com inseticidas, sendo uma interessante fonte de futuros estudos envolvendo sua ação biológica.

Além disto, podemos utilizar os constituintes principais do óleo essencial desta espécie como o apiol e dilapiol, que possuem estrutura semelhante ao do safrol (figura 10, página 24), como precursores para a síntese orgânica de outras substâncias.

**Tabela 17.** Constituição química das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* var. *pallescens* (C.DC) Yuncker (coleta de 12/12/00).

| Nome Composto           | a grau de  |              | b        | c     | d       | e       |
|-------------------------|------------|--------------|----------|-------|---------|---------|
|                         | C.A.S.     | similaridade | TR (min) | %     | IR Lit. | IR Obs. |
| alfa pineno*            | 80-56-8    | 97/97/96     | 10,39    | 0,54  | 939     | <<      |
| eucaliptol / 1,8 cineol | 470-82-6   | 97/95/95     | 12,91    | 0,21  | 1033    | 1021    |
| beta cariofileno*       | 87-44-5    | 99/98/98     | 36,75    | 1,00  | 1418    | <<      |
| alfa humuleno           | 6753-98-6  | 95           | 40,05    | 0,22  | 1454    | 1463    |
| alfa amorfeno           | 23515-88-0 | 99/99        | 42,03    | 1,62  | 1469    | 1476    |
| miristicina             | 607-91-0   | 99/99        | 44,14    | 2,10  | 1520    | 1497    |
| biciclogermacreno       | 24703-35-3 | 99/96        | 44,94    | 2,63  | 1494    | 1505    |
| elemicina               |            |              | 47,51    | 2,30  | 1554    | 1529    |
| elemol*                 | 639-99-6   | 91/68/46     | 49,79    | 0,47  | 1549    | <<      |
| nerolidol               | 7212-44-4  | 91/91        | 50,90    | 1,86  |         | 1563    |
| espatulenol             | 6750-60-3  | 90/74/74     | 53,18    | 1,57  | 1576    | 1590    |
| epiglobulol             | 552-02-3   | 83           | 54,08    | 0,47  |         | 1600    |
| dilapiol*               |            | 97/96        | 56,02    | 18,33 | 1622    | <<      |
| guaiol                  | 489-86-1   | 70           | 56,92    | 0,94  | 1595    | 1633    |
| torreiol                | 19435-97-3 | 97           | 58,46    | 1,20  | 1645    | 1652    |
| beta eudesmol           | 473-15-4   | 94/90/59     | 59,46    | 5,93  | 1649    | 1663    |
| apiol*                  | 523-80-8   | 99/99/99     | 60,91    | 53,69 | 1680    | <<      |
| Total(%)                |            |              |          | 95,08 |         |         |

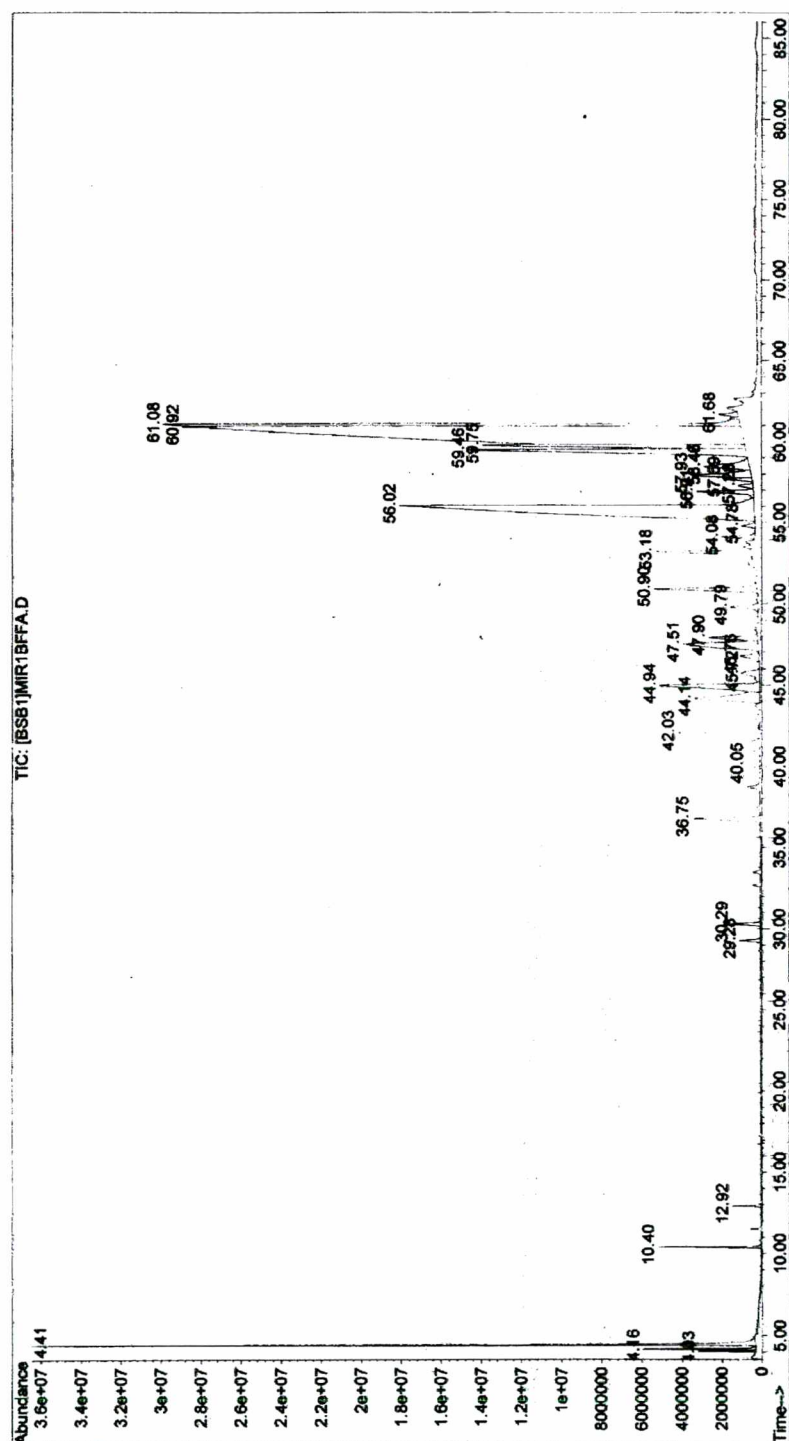
Programação rampa de aquecimento 04 – 80°C por 1 minuto, de 80°C - 140°C (12°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 140°C – 160°C (2°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 160°C – 250°C (3°C/min) permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. – Índice de Retenção observado.

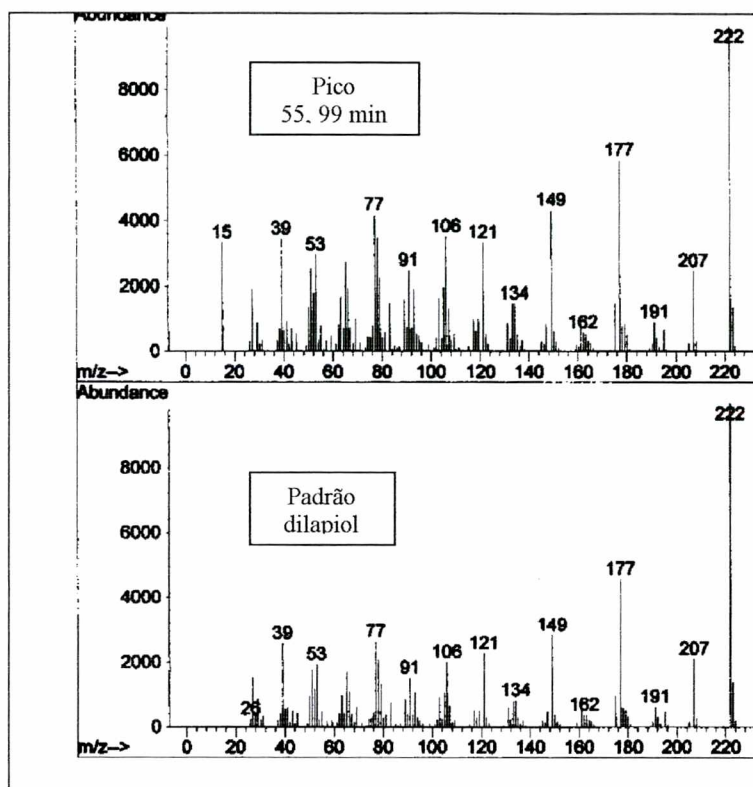
Analisando comparativamente a constituição química dos óleos da espécie *Piper regnellii* var. *pallescens*, das coletas de 20/03/00 e 12/12/00 (folhas frescas), verificamos a grande similaridade entre os mesmos, onde temos, respectivamente, 89% e 93% de composição comum entre si, mesmo em épocas diferentes do ano. Estes componentes comuns nas diferentes coletas são evidenciados em azul nas tabelas 16 e 17.

A figura 25 mostra cromatograma de massa realizado das folhas frescas do óleo essencial da coleta de 12/12/00. As figuras 26 e 27 mostram espectros comparativos com a

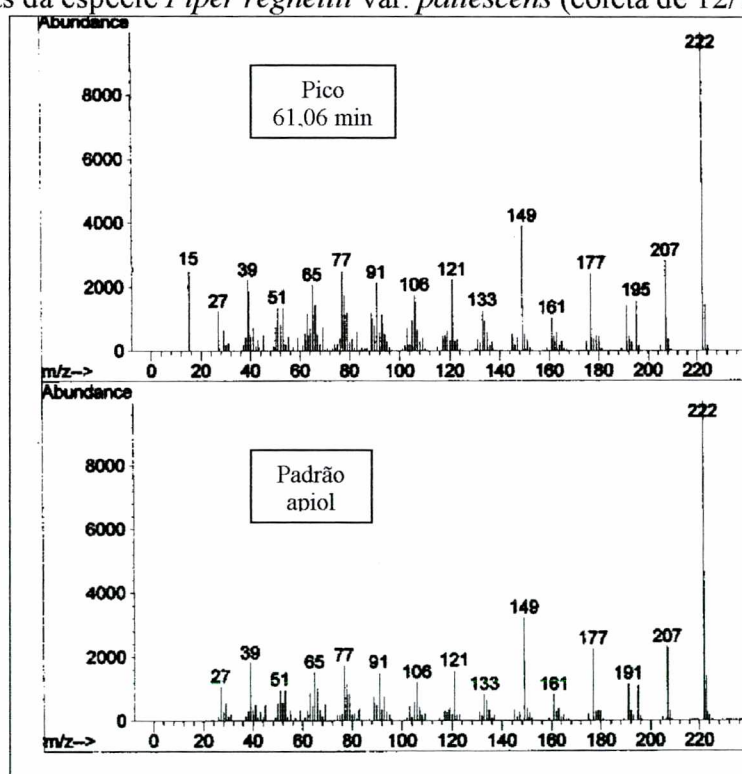


biblioteca de dados de CG-EM dos dois principais componentes do óleo essencial das folhas da *Piper regnellii* var. *pallescens*, o dilapiol e o apiol.



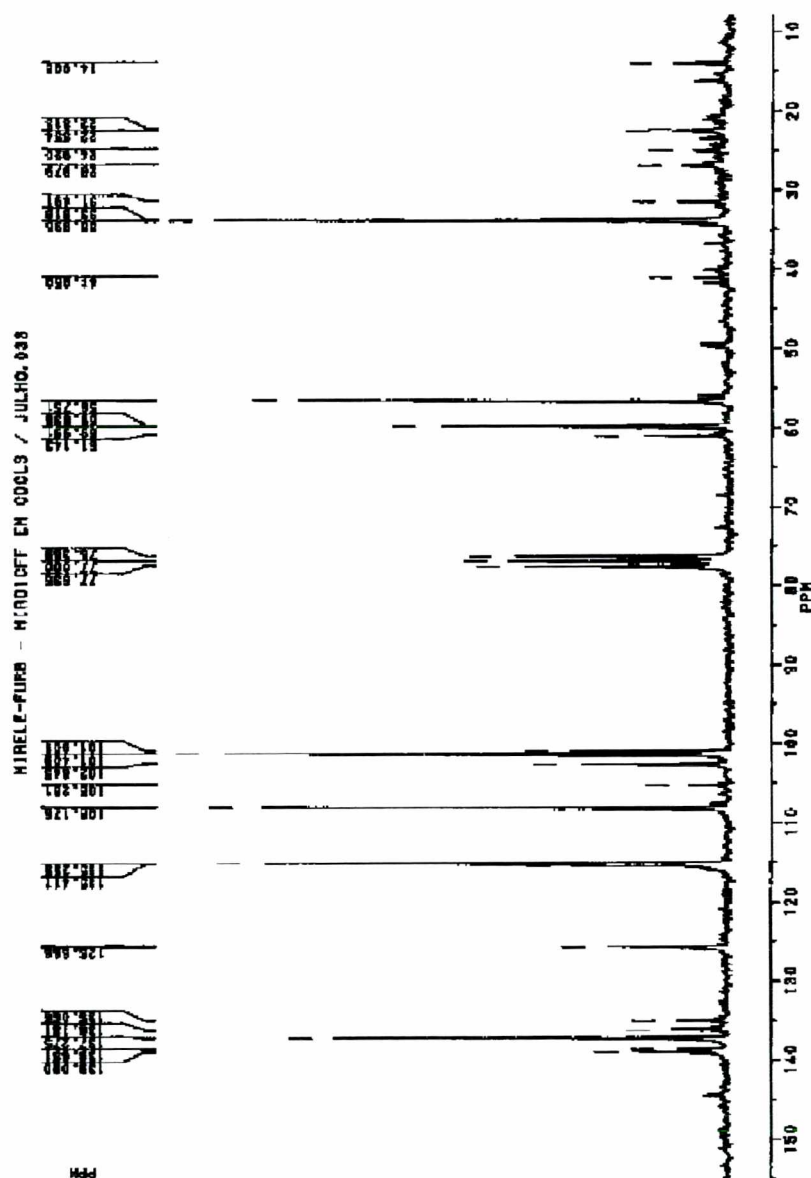


**Figura 26.** Espectro comparativo de massa de dilapiol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* var. *pallenscens* (coleta de 12/12/00).

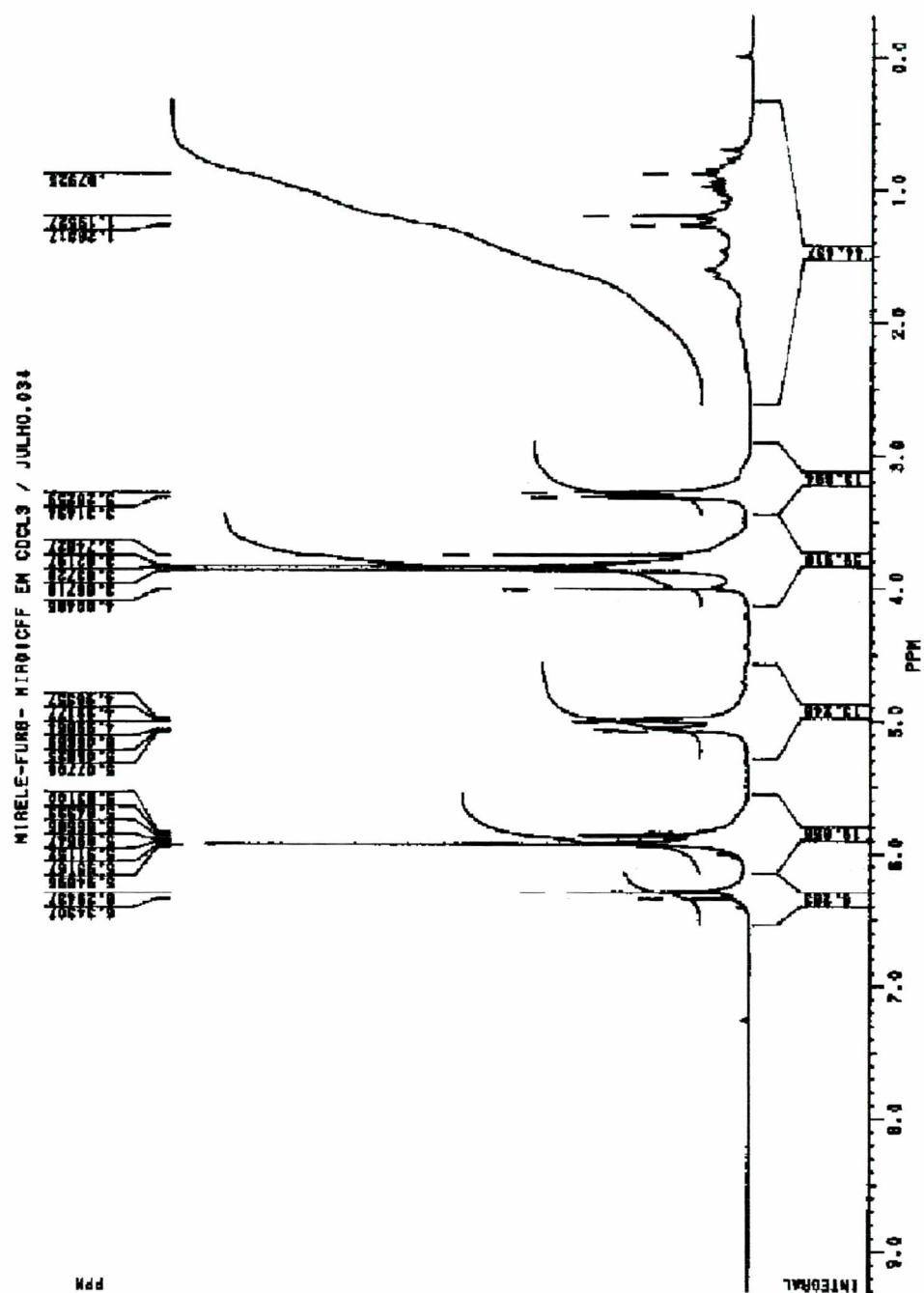


**Figura 27.** Espectro comparativo de massa de apiol, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* var. *pallenscens* (coleta de 12/12/00).

Já as figuras 28 e 29 mostram os espectros de RNM  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  respectivamente, do óleo essencial bruto da coleta de 14/02/01 (folhas frescas). Por se tratar de um óleo onde cerca de 70% de sua constituição é composto praticamente por dois componentes, os fenilpropanóides dilapiol e apiol. Conforme apresentado na figura 10, estes possuem estruturas bastante semelhantes entre si, pode-se verificar que os sinais principais são característicos destes sesquiterpenos. Assim, os espectros possuem poucas absorções, o que não seria de se esperar de um óleo essencial bruto.



**Figura 28.** Espectro de RNM  $^{13}\text{C}$  (25 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óleo essencial da *Piper regnellii* var. *pallescens*, folhas frescas (coleta de 14/02/01).





#### 5.4.2 *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii*

A realização de estudos da espécie coletada em setembro de 2000 no município de Timbó foi dificultada pela escassez de planta disponível no local, mas sua exsiccata possui uma peculiaridade de a planta estar na fase de inflorescência, que ocorre poucos dias ao ano.

Na espécie coletada em Brusque também impossibilitou a repetição de coletas pelo fato desta estar situada num aterro e este local foi devastado para a construção civil.

Na localizada no campus I da FURB, pode-se realizar várias coletas onde, na figura 30 apresenta-se o cromatograma de CG-EM e seus constituintes químicos encontram-se nas tabelas 18, 19 e 20.

**Tabela 18.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii* (coleta de 07/06/00).

| Composto                 | a<br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | b<br>TR (min) | c<br>% | d<br>IR Lit. |
|--------------------------|-------------|-------------------------|---------------|--------|--------------|
| alfa tujeno              | 02867-05-2  | 91/91                   | 13,03         | 0,19   | 931          |
| alfa pineno              | 80-56-8     | 97/96/96                | 13,53         | 2,09   | 939          |
| sabineno                 | 3387-41-5   | 96/94                   | 15,19         | 0,22   | 976          |
| beta pineno              | 127-91-3    | 97/97/96                | 15,69         | 11,68  | 980          |
| mirreno                  | 123-35-3    | 97/97/96                | 15,79         | 6,79   | 991          |
| para cimeno              | 99-87-6     | 95/95                   | 17,66         | 0,84   | 1026         |
| limoneno                 | 138-86-3    | 98/98/98                | 18,26         | 2,20   | 1031         |
| linalol                  | 78-70-6     | 96/96/94                | 22,46         | 2,34   | 1098         |
| terpineol -4             | 562-74-3    | 97/97/96                | 29,56         | 0,71   | 1189         |
| alfa terpineol           | 98-55-5     | 55/55/53                | 30,33         | 0,23   | 1189         |
| bornil acetato           | 76-49-3     | 98/98                   | 36,67         | 0,28   | 1285         |
| neril acetato            | 141-12-8    | 91/91/91                | 41,46         | 0,56   | 1365         |
| alfa copaeno             | 3856-25-5   | 99/99/99                | 44,88         | 2,04   | 1376         |
| trans (beta) cariofileno | 87-44-5     | 99/99/99                | 48,94         | 1,23   | 1418         |
| germacreno D             | 23986-74-5  | 99/98/97                | 49,76         | 0,85   | 1480         |
| aromadendreno            | 489-39-4    | 99/99/99                | 51,1          | 4,09   | 1439         |
| alfa muuroleno           | 31983-22-9  | 98/97                   | 56,86         | 1,83   | 1499         |
| calameneno               | 483-77-2    | 97/97/95                | 58,41         | 0,68   | 1521         |
| delta cadineno           | 483-76-1    | 99/98/97                | 58,71         | 4,13   | 1524         |
| nerolidol                | 7212-44-4   | 97/91/91                | 61,01         | 5,17   |              |
| espatulenol              | 77171-55-2  | 99/99/98                | 62,44         | 8,92   | 1576         |
| globulol                 | 489-41-8    | 99/99/98                | 63,04         | 6,61   | 1583         |
| T-muurolol               | 19912-62-0  | 93                      | 65,47         | 5,63   |              |
|                          |             |                         | Total (%)     | 69,31  |              |

Programação rampa de aquecimento 03 – 80°C por 10 minutos, de 80°C - 150°C (4°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150°C – 180°C (4°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180°C – 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).

**Tabela 19.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii* (coleta de 19/08/00).

| Composto           | <sup>a</sup> C.A.S. | grau de similaridade | <sup>b</sup> TR (min) | <sup>c</sup> % | <sup>d</sup> IR Lit. |
|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| alfa tujeno        | 02867-05-2          | 97/97/95             | 13,07                 | 0,53           | 931                  |
| alfa pineno        | 80-56-8             | 97/97/97             | 13,61                 | 3,96           | 939                  |
| beta pineno        | 127-91-3            | 97/95/94             | 16,05                 | 23,42          | 980                  |
| alfa felandreno    | 99-83-2             | 97/96/95             | 16,95                 | 0,63           | 1005                 |
| limoneno           | 138-86-3            | 87                   | 18,47                 | 4,33           | 1031                 |
| trans beta ocimeno | 3779-61-1           | 98/97                | 19,05                 | 1,64           | 1050                 |
| gama terpineno     | 99-85-4             | 97/96/96             | 20,09                 | 0,49           | 1062                 |
| linalol            | 78-70-6             | 97/96/94             | 22,70                 | 3,92           | 1098                 |
| sabineno hidrato   | 15826-82-1          | 98                   | 22,98                 | 0,53           | 1068                 |
| terpinen-4-ol      | 562-74-3            | 97/97/97             | 29,64                 | 1,07           | 1189                 |
| bornil acetato     | 76-49-3             | 97/97/97             | 36,69                 | 0,52           | 1285                 |
| bicicloelemeno     |                     | 95                   | 41,37                 | 0,66           |                      |
| neril acetato      | 141-12-8            | 91/91                | 41,47                 | 0,78           | 1365                 |
| alfa copaeno       | 3856-25-5           | 99/99/99             | 44,96                 | 1,34           | 1376                 |
| beta cariofileno   | 87-44-5             | 99/99/99             | 49,08                 | 1,76           | 1418                 |
| aromadendreno      | 489-39-4            | 99/99/99             | 51,26                 | 3,30           | 1439                 |
| alfa amorfeno      | 23515-88-0          | 99/98/98             | 54,42                 | 0,48           |                      |
| germacreno D       | 23986-74-5          | 98/96                | 56,78                 | 4,57           | 1480                 |
| biciclogermacreno  | 24703-35-3          | 98/96/91             | 57,19                 | 5,32           | 1494                 |
| gama cadineno      | 39029-41-9          | 78                   | 58,41                 | 2,27           | 1513                 |
| delta cadineno     | 483-76-1            | 99/99/99             | 58,94                 | 4,10           | 1524                 |
| espatulenol        | 6750-60-3           | 99/96/87             | 62,63                 | 6,6            | 1576                 |
| globulol           | 489-41-8            | 99/99/99             | 63,22                 | 5,04           | 1583                 |
| epiglobulol /      | 552-02-3            | 66/64/59             | 63,53                 | 1,31           | 1590                 |
| alfa cadinol       | 481-34-5            | 98                   | 66,09                 | 2,21           | 1653                 |
| Total (%)          |                     |                      |                       | 80,8           |                      |

Programação rampa de aquecimento 03 – 80°C por 10 minutos, de 80°C - 150°C (4°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150°C – 180°C (4°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180°C – 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).

Pode-se verificar que estes cromatogramas apresentam um complexo número de constituintes, sendo os assinalados em azul os componentes encontrados em comum nas análises (tabelas 18, 19 e 20). Os principais encontrados na coleta de 31/01/01 (tabela 20) são: beta pineno (22,44%), biciclogermacreno (8,10%) e espatulenol (9,33%).

Utilizou-se como padrão para a determinação do índice de retenção no óleo da coleta 31/01/01 (tabela 20) o alfa pineno, limoneno, linalol, biciclogermacreno, espatulenol e alfa cadinol. Vários picos não foram identificados por CG-EM, mas a soma destes representa 7,49% de constituintes (tabela 20).

**Tabela 20.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii* (coleta de 31/01/01).

| Composto                 | <sup>a</sup><br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | <sup>b</sup><br>TR (min) | <sup>c</sup><br>% | <sup>d</sup><br>IR Lit. | <sup>e</sup><br>RI Obs. |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| alfa tujeno              | 02867-05-2             | 91                      | 9,92                     | 0,43              | 931                     |                         |
| alfa pineno*             | 80-56-8                | 97/97/96                | 10,23                    | 2,92              | 939                     | <                       |
| beta pineno              | 127-91-3               | 96/96/96                | 11,41                    | 22,44             | 980                     | 985                     |
| alfa felandreno          | 99-83-2                | 93                      | 11,97                    | 0,45              | 1005                    | 1006                    |
| alfa terpineno           | 99-86-5                | 95/95/95                | 12,27                    | 0,24              | 1018                    | 1016                    |
| para cimeno              | 99-87-6                | 97/95                   | 12,34                    | 0,71              | 1026                    | 1019                    |
| cis ocimeno              | 27400-71-1             | 95                      | 12,42                    | 0,26              |                         | 1022                    |
| limoneno*                | 138-86-3               | 99/98/97                | 12,70                    | 2,87              | 1031                    | <                       |
| beta trans ocimeno       |                        | 98                      | 12,78                    | 2,31              | 1050                    | 1034                    |
| gamma terpineno          | 99-85-4                | 97/95/95                | 13,47                    | 0,38              | 1062                    | 1059                    |
| cis sabineno hidratado   | 15826-82-1             | 96                      | 13,78                    | 0,20              | 1068                    | 1070                    |
| linalol*                 | 78-70-6                | 96/95/94                | 14,60                    | 2,76              | 1098                    | <                       |
| trans sabineno hidratado | 17699-16-0             | 94                      | 14,97                    | 0,29              | 1097                    | 1107                    |
| terpinen-4-ol            | 562-74-3               | 97/96/95                | 18,70                    | 0,62              | 1177                    | 1186                    |
| bornil acetato           | 76-49-3                | 93                      | 24,59                    | 0,35              | 1285                    | 1283                    |
| neril acetato            | 141-12-8               | 90/90/87                | 28,68                    | 0,72              | 1365                    | 1338                    |
| bicicloelemeno           |                        | 91                      | 28,90                    | 0,91              |                         | 1341                    |
| alfa copaeno             | 3856-25-5              | 99/99/99                | 32,28                    | 1,12              | 1376                    | 1380                    |
| trans cariofileno (beta) | 87-44-5                | 99/99/99                | 36,26                    | 1,68              | 1418                    | 1421                    |
| germacreno-D             | 23986-74-5             | 96/95/94                | 36,95                    | 0,71              | 1480                    | 1428                    |
| aromadendreno            | 489-39-4               | 99/99/99                | 38,33                    | 3,03              | 1439                    | 1440                    |
| biciclogermacreno*       | 24703-35-3             | 98/97                   | 44,52                    | 8,10              | 1494                    | <                       |
| gamma cadineno           | 39029-41-9             |                         | 46,23                    | 1,99              | 1513                    | 1512                    |
| delta cadineno           |                        |                         | 47,13                    | 4,52              | 1524                    | 1520                    |
| nerolidol                |                        |                         | 50,63                    | 5,44              |                         | 1554                    |
| espatulenol*             | 6750-60-3              | 98/93/90                | 53,11                    | 9,33              | 1576                    | <                       |
| cariofileno óxido        | 1139-30-6              |                         | 53,40                    | 2,05              | 1581                    | 1580                    |
| globulol                 | 489-41-8               | 99/99/99                | 53,99                    | 4,86              | 1583                    | 1588                    |
| viridiflorol             | 552-02-3               | 99                      | 54,46                    | 2,35              | 1590                    | 1595                    |
| rosifoliol               |                        |                         | 55,11                    | 1,01              |                         | 1603                    |
| beta eudesmol            | 473-15-4               | 68                      | 56,78                    | 1,34              | 1649                    | 1625                    |
| alfa cadinol             | 481-34-5               | 89/64                   | 58,04                    | 4,27              | 1653                    | 1642                    |
| (alfa) eudesmol          |                        |                         | 58,82                    | 0,95              | 1652                    | 1651                    |
| alfa cadinol*            | 481-34-5               | 62/62                   | 58,94                    | 1,28              | 1653                    | <                       |
| Total (%)                |                        |                         |                          | 92,89             |                         |                         |

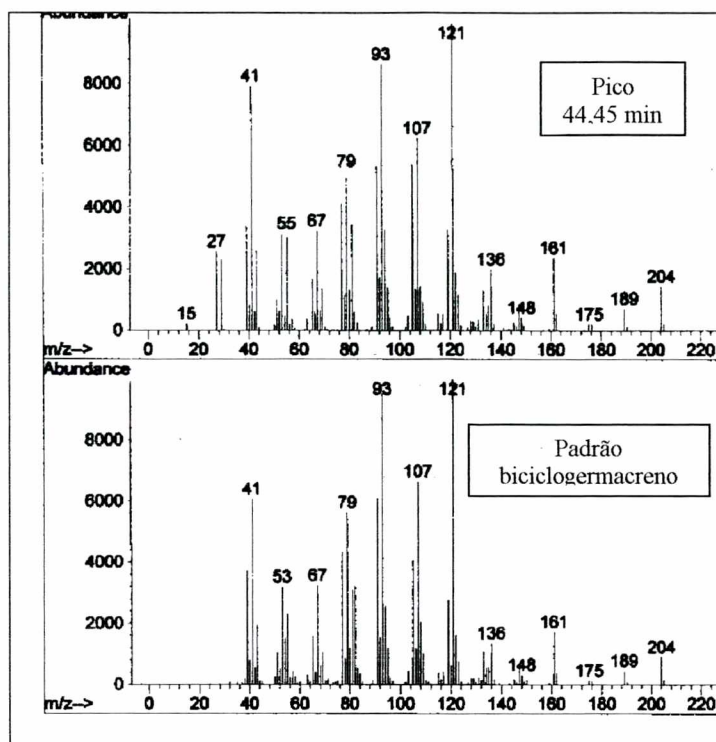
Programação rampa de aquecimento 04 – 80°C por 1 minuto, de 80°C - 140°C (12 °C/min) permanecendo por 10 minutos, de 140°C – 160°C (2°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 160°C – 250°C (3°C/min) permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. – Índice de Retenção observado.

A análise comparativa realizada entre as diferentes coletas (07/06/00, 19/08/00 e 31/01/01) referentes às tabelas 18, 19 e 20 resultou numa concentração de 43%, 60% e 54% de similaridade.

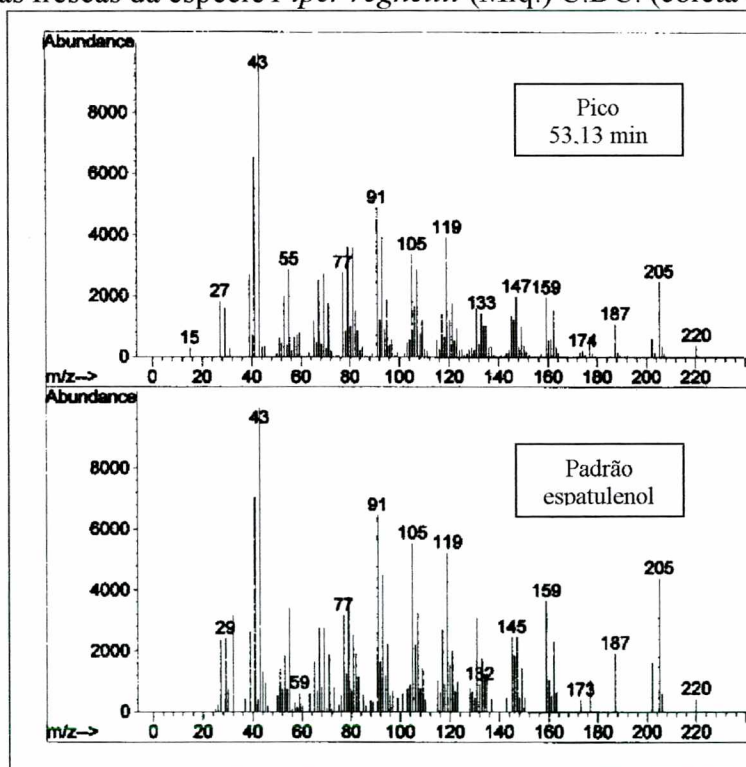
A figura 30 mostra cromatograma do óleo da coleta de 31/01/01, e as figuras 31 e 32 mostram espectros comparativos de CG-EM de dois dos principais componentes do óleo essencial das folhas da *Piper regnellii* (Miq.) C.DC., biciclogermacreno e espatulenol.







**Figura 31.** Espectro comparativo de massa do bicylogermacrene da análise do óleo das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. (coleta de 31/01/01).



**Figura 32.** Espectro comparativo de massa do spatulenol, da análise do óleo das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. (coleta de 31/01/01).

Nas tabelas 21 e 22 temos os resultados de CG-EM de folhas frescas e secas, respectivamente, da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC, var. *regnellii*, coletada no município de Brusque. Os óleos foram não apresentaram constituintes em grandes concentrações, sendo os principais: beta-cariofileno (8%), aromadendreno (9%), calameneno (7%) e espatulenol (4%).

Pode-se verificar também a variação na composição do óleo essencial em relação às folhas frescas (tabela 21) e folhas secas (tabela 22) da coleta de 28/06/00. Assinalados em azul, tem-se a similaridade entre suas composições resultando em 46 e 33% , respectivamente. Este resultado mostra a dificuldade em se extrair óleo essencial de pequenas quantidades de planta, onde uma margem de erro e contaminações pelo solvente tornam-se evidenciados.

**Tabela 21.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii* (coleta de 28/06/00).

| Composto                 | a           | grau de similaridade | b        | c     | d       |
|--------------------------|-------------|----------------------|----------|-------|---------|
| C.A.S.                   |             |                      | TR (min) | %     | IR Lit. |
| terpinen-4-ol            | 562-74-3    | 97/97/96             | 29,61    | 0,11  | 1189    |
| delta elemeno            | 20307-84-0  | 98/96                | 41,66    | 2,48  | 1339    |
| alfa cubebeno            | 17699-14-8  | 99/99/99             | 42,64    | 1,15  | 1351    |
| alfa copaeno             | 03856-25-5  | 99/99/99             | 45,04    | 1,12  | 1376    |
| beta elemeno             | 515-13-9    | 99/97/95             | 46,29    | 3,59  | 1391    |
| alfa gurjuneno           | 489-40-7    | 99/98/98             | 48,33    | 0,67  | 1409    |
| trans (beta) cariofileno | 87-44-5     | 99/99/99             | 49,98    | 8,42  | 1418    |
| alfa guaiano             | 03691-12-1  | 99/99/99             | 50,71    | 0,28  | 1439    |
| trans (beta) farneseno   | 28973-97-9  | 98/93/93             | 51,93    | 0,92  | 1458    |
| alfa humuleno            | 6753-98-6   | 96/95/95             | 52,92    | 1,42  | 1454    |
| aromadendreno            | 25246-27-9  | 99/99                | 54,53    | 8,82  |         |
| ar-curcumeno             | 644-30-4    | 98/96/93             | 55,16    | 2,82  | 1483    |
| germacreno D             | 23986-74-5  | 98/98                | 56,21    | 4,64  | 1480    |
| alfa zingibereno         | 495-60-3    | 93/93/90             | 57,02    | 3,02  | 1495    |
| biciclogermacreno        | 100762-46-7 | 93/91                | 57,57    | 3,57  | 1494    |
| alfa muuroleno           | 31983-22-9  | 98/98/97             | 57,96    | 4,72  | 1499    |
| selineno                 | 17066-67-0  | 92/89                | 58,4     | 0,53  |         |
| calameneno               | 483-77-2    | 97/96/91             | 59,42    | 6,71  | 1521    |
| delta cadineno           | 39029-41-9  | 99/99                | 59,54    | 1,16  | 1524    |
| cadina-1,4-dieno         |             | 96/96                | 60,05    | 0,76  | 1532    |
| calacoreno               | 21391-99-1  | 68/59                | 60,3     | 0,14  | 1542    |
| elemol                   | 639-99-6    | 96/94/91             | 60,56    | 0,54  | 1549    |
| espatulenol              | 77171-55-2  | 95/87/72             | 62,74    | 4,24  | 1576    |
| cariofileno óxido        | 1139-30-6   | 46                   | 63,07    | 1,68  | 1581    |
| globulol                 | 51371-47-2  | 99/99                | 63,27    | 0,67  | 1583    |
| viridiflorol             | 552-02-3    | 98/93                | 63,65    | 0,67  | 1590    |
| Total (%)                |             |                      |          | 64,85 |         |

Programação rampa de aquecimento 03 - : 80°C por 10 minutos, de 80°C - 150°C (4°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150°C - 180°C (4°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180°C - 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).



Apesar de não termos a elucidação de seus componentes em grande proporção (cerca de 65 e 43% foram elucidados das folhas secas e frescas, respectivamente), podemos verificar variações entre seus constituintes majoritários, em relação ao óleo da espécie coletada no município de Blumenau (campus da FURB). Isto nos faz notar que, dependendo do local onde a planta vive, tipo de solo e de vegetação, por exemplo, podem alterar a composição de seu óleo.

**Tabela 22.** Constituição química do óleo essencial das folhas secas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC., var. *regnellii* (coleta de 28/06/00).

| Composto          | a<br>C.A.S. | grau de<br>similaridade | b<br>TR (min) | c<br>% | d<br>IR Lit. |
|-------------------|-------------|-------------------------|---------------|--------|--------------|
| alfa pineno       | 80-56-8     | 93                      | 40,74         | 0,34   | 939          |
| alfa cubebeno     | 17699-14-8  | 99/98/98                | 41,79         | 0,41   | 1351         |
| alfa copaeno      | 3856-25-5   | 99/99/99                | 44,16         | 0,27   | 1376         |
| beta elemeno      | 515-13-9    | 96/94/94                | 45,1          | 1,57   | 1391         |
| beta cariofileno  | 87-44-5     | 99/99/99                | 48,25         | 3,21   | 1418         |
| alfa humuleno     | 6753-98-6   | 96/95/95                | 51,49         | 0,57   | 1454         |
| aromadendreno     | 25246-27-9  | 99/99/99                | 52,41         | 2,93   | 1461         |
| ar-curcumeno      | 644-30-4    | 98/95                   | 53,3          | 1,15   | 1483         |
| ledeno            | 21747-46-6  | 90/90/89                | 53,87         | 0,27   | 1493         |
| germacreno D      | 23986-74-5  | 99/99/98                | 54,33         | 0,72   | 1480         |
| calameneno        | 483-77-2    | 98/96/96                | 57,99         | 8,25   | 1521         |
| delta cadineno    | 39029-41-9  | 98/98/96                | 58,15         | 1,31   | 1524         |
| nerolidol         | 7212-44-4   | 91/91/91                | 60,48         | 1,4    |              |
| espatulenol       | 6750-60-3   | 99/96/95                | 62,02         | 10,05  | 1576         |
| cariofileno óxido | 1139-30-6   | 94/93/93                | 62,29         | 2,81   | 1581         |
| viridiflorol      | 552-02-3    | 91/91                   | 62,47         | 0,79   | 1590         |
| ledol             | 577-27-5    | 99/99/97                | 63,58         | 4,07   | 1565         |
| torreiol (delta)  | 19435-97-3  | 99                      | 65,2          | 2,6    | 1645         |
| eicosano          | 112-95-8    | 97/95/93                | 77,24         | 0,1    | 2000         |
|                   |             |                         | Total (%)     | 42,82  |              |

Programação rampa de aquecimento 03 80°C por 10 minutos, de 80°C - 150°C (4°C/min) permanecendo por 10 minutos, de 150°C - 180°C (4°C/min) permanecendo por 20 minutos e de 180°C - 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).

Analisando os resultados das espécies *Piper regnellii* var. *pallescens* e var. *regnellii*, pode-se verificar a grande variação em seus componentes de óleo essencial, onde, mesma da sua proximidade taxonômica, a sua diferença química é distinta.

### 5.5 *Piper mollicomum* Kunth

A tabela 23 mostra o grau de desidratação das folhas das espécies de *Piper mollicomum* Kunth, sendo que seus resultados foram muito satisfatórios, oscilando entre 80% e 82%.

**Tabela 23.** Grau de desidratação das folhas da *Piper mollicomum* Kunth após secagem a temperatura ambiente.

| Data<br>Coleta | Perda<br>Água |
|----------------|---------------|
| 11/03/00       | 80,80%        |
| 01/04/00       | 81,49%        |
| 13/05/00       | 81,17%        |
| 06/06/00       | 81,84%        |
| 09/12/00       | 80,52%        |
| 24/03/01       | 79,92%        |

A tabela 24 mostra que os resultados obtidos com a espécie *Piper mollicomum*, ocorreram variações no teor de óleo essencial. Nas folhas frescas, esta variação oscilou entre 0,12 % e 0,51%.

Tanto as revelações das cromatoplasas com iodo, quanto em ultravioleta apresentaram manchas características na maioria dos óleos testados.

A densidade do óleo das folhas frescas variou de 0,8601 a 0,9141 g/mL e o índice de refração de 1,4742 (folha fresca) a 1,5112 (folha seca).

Com estes resultados, pode-se verificar a constância de seus resultados, o que indica ser uma espécie que não sofreu grandes alterações intrínsecas e extrínsecas ao meio em que vive. E este fato pode ser justificado pelo fato desta espécie estar situada na mata nativa primária de uma reserva (Parque São Francisco de Assis, em Blumenau), portanto, longe das alterações proporcionadas pelo homem e em harmonia com a natureza.

**Tabela 24.** Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie *Piper mollicomum* Kunth, teste de fluorescência e revelação com iodo das placas de CCD e resultados de densidade e índice de refração dos óleos.

| Data Coleta | Parte Analisada  | Rendimento Óleo | Fluorescência | Revelação Iodo | Densidade (g/mL) | Índice Refração |
|-------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|------------------|-----------------|
| 11/03/00    | folha fresca     | 0,16%           | presente      | presente       | <<<              | <<<             |
|             | folha seca       | 0,40%           | <<<           | <<<            | <<<              | 1,5112          |
|             | fruto            | 0,04%           | ausente       | ausente        | <<<              | <<<             |
| 01/04/00    | folha fr. e seca | 0,14%           | presente      | presente       | 0,86008          | 1,4784          |
|             | caule fresco     | 0,01%           | ausente       | presente       | <<<              | <<<             |
| 13/05/00    | folha fresca     | 0,12%           | presente      | presente       | 0,8727           | 1,5024          |
|             | folha seca       | 0,19%           | presente      | presente       | <<<              | 1,4983          |
|             | caule fresco     | 0,03%           | presente      | presente       | <<<              | 1,4962          |
| 06/06/00    | folha fresca     | <<<             | presente      | presente       | 0,9141           | 1,5084          |
|             | folha seca       | 0,38%           | presente      | presente       | <<<              | 1,4888          |
|             | caule fresco     | 0,03%           | presente      | presente       | <<<              | 1,5045          |
| 09/12/00    | folha fresca     | 0,51%           | presente      | presente       | 0,8620           | 1,4742          |
| 24/03/01    | folha fresca     | 0,16%           | presente      | presente       | 0,8966           | 1,4978          |

As tabelas 25, 26, 27 e 28 mostram resultados de CG-EM do óleo essencial das coletas da espécie *Piper mollicomum*, realizadas em 01/04/00, 13/05/00, 06/06/00 e 09/12/00, respectivamente, onde em azul temos componentes comuns em todas as extrações.

Assim, com as concentrações de 18%, 14%, 18% e 18%, respectivas às tabelas 25, 26, 27 e 28, podemos verificar que obteve-se baixa porcentagem de componentes, indicando hegemonia entre a espécie *Piper mollicomum*.

Na tabela 28, assinalado em asterisco, encontra-se os componentes utilizados como padrão para a determinação do índice de retenção, sendo eles: alfa-pineno, limoneno, trans-cariofileno, E,E-alfa-farneseno, espatulenol e torreiol (delta cadinol).



**Tabela 25.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 01/04/00).

| <b>Composto</b>                 | <b>a</b><br><b>C.A.S.</b> | <b>grau de</b><br><b>similaridade</b> | <b>b</b><br><b>TR (min)</b> | <b>c</b><br><b>%</b> | <b>d</b><br><b>IR Lit.</b> |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| alfa tujeno                     | 002867-05-2               | 94/94                                 | 9,25                        | 0,23                 | 931                        |
| alfa pineno                     | 000080-56-8               | 97/97/95                              | 9,76                        | 9,83                 | 939                        |
| canfeno                         | 000079-92-5               | 98/97/97                              | 10,21                       | 0,37                 | 953                        |
| sabineno                        | 003387-41-5               | 97/97/96                              | 10,82                       | 1,95                 | 976                        |
| beta pineno                     | 000127-91-3               | 96/95/95                              | 11,45                       | 22,74                | 980                        |
| alfa felandreno                 | 000099-93-2               | 97/96/95                              | 11,97                       | 2,33                 | 1005                       |
| alfa terpineno                  | 000099-86-5               | 98/97/97                              | 12,4                        | 0,46                 | 1018                       |
| para cimeno                     | 000099-87-6               | 96                                    | 12,54                       | 3,44                 | 1026                       |
| limoneno                        | 000128-86-3               | 99/98                                 | 13,01                       | 8,30                 | 1031                       |
| beta ocimeno                    | 003779-61-1               | 97/96/96                              | 13,21                       | 1,61                 | 1040                       |
| gama terpineno                  | 000099-85-4               | 97/97/97                              | 13,97                       | 1,02                 | 1062                       |
| <b>cis sabineno hidratado</b>   | <b>015826-82-1</b>        | <b>93</b>                             | <b>14,29</b>                | <b>0,55</b>          | <b>1068</b>                |
| alfa terpinoleno                | 000586-62-9               | 98/98/98                              | 15,32                       | 0,92                 |                            |
| <b>trans sabineno hidratado</b> | <b>017699-16-0</b>        | <b>98/97</b>                          | <b>15,6</b>                 | <b>0,55</b>          | <b>1097</b>                |
| terpineol-4                     | 000562-74-3               | 98/97/97                              | 19,33                       | 1,39                 | 1177                       |
| <b>alfa copaeno</b>             | <b>3856-25-5</b>          | <b>99/99/99</b>                       | <b>33,43</b>                | <b>0,7</b>           | <b>1376</b>                |
| alfa gurjuneno                  | 489-40-7                  | 99/99/99                              | 35,57                       | 0,12                 | 1409                       |
| <b>trans cariofileno</b>        | <b>87-44-5</b>            | <b>99/99/99</b>                       | <b>36,32</b>                | <b>7,15</b>          | <b>1404</b>                |
| beta farneseno                  | 28973-97-9                | 96/76/68                              | 37,2                        | 0,22                 |                            |
| <b>aromadendreno</b>            | <b>489-39-4</b>           | <b>99/99/99</b>                       | <b>38,78</b>                | <b>2,79</b>          | <b>1439</b>                |
| germacreno D                    | 23986-74-5                | 96/96/95                              | 39,83                       | 0,35                 | 1480                       |
| alfa farneseno                  | 502-61-4                  | 99/91/90                              | 40,58                       | 2,99                 | 1508                       |
| biciclogermacreno               | 24703-35-3                | 99/98/93                              | 41,06                       | 4,31                 | 1494                       |
| <b>delta cadineno</b>           | <b>483-76-1</b>           | <b>99/98/98</b>                       | <b>42,37</b>                | <b>1,22</b>          | <b>1524</b>                |
| <b>espatulenol</b>              | <b>6750-60-3</b>          | <b>97/96/95</b>                       | <b>46,85</b>                | <b>2,97</b>          | <b>1576</b>                |
| <b>cariofileno oxido</b>        | <b>1139-30-6</b>          | <b>93/93/91</b>                       | <b>47,47</b>                | <b>0,82</b>          | <b>1581</b>                |
| <b>globulol</b>                 | <b>489-41-8</b>           | <b>99/99/96</b>                       | <b>47,73</b>                | <b>0,69</b>          | <b>1583</b>                |
| viridiflorol                    | 552-02-3                  | 99/90                                 | 48,44                       | 0,36                 | 1590                       |
| torreiol                        | 19435-97-3                | 99                                    | 52,82                       | 1,65                 | 1645                       |
| heptadecano                     | 629-78-7                  | 95/94                                 | 58,72                       | 0,11                 | 1700                       |
| octadecano                      | 593-45-3                  | 97/96/96                              | 64,38                       | 0,12                 | 1800                       |
| fitol                           | 150-86-7                  | 95/95/93                              | 76,59                       | 0,14                 | 1949                       |
|                                 |                           |                                       | Total(%)                    | 82,40                |                            |

Programação rampa de aquecimento 02 - 120°C por 10 minutos, de 120°C - 150°C (4°C/min), permanecendo por 10 minutos, de 150°C - 180°C (4°C/min), permanecendo por 20 minutos, e de 180°C - 250°C (6°C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto;; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).

**Tabela 26.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 13/05/00) utilizando rampa de aquecimento 02, conforme tabela 25.

| <b>Composto</b>                 | <b>a<br/>C.A.S.</b> | <b>grau de<br/>similaridade</b> | <b>b<br/>TR (min)</b> | <b>c<br/>%</b> | <b>d<br/>IR Lit.</b> |
|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| 2-hexenal                       | 000505-57-7         | 96                              | 12,49                 | 1,40           |                      |
| canfeno                         | 000079-92-5         | 97                              | 19,36                 | 0,71           | 953                  |
| alfa terpineno                  | 000099-86-5         | 95                              | 22,74                 | 0,63           | 1018                 |
| trans-beta-ocimeno              | 003779-61-1         | 91                              | 23,61                 | 6,03           | 1040                 |
| <b>trans-sabineno hidratado</b> | <b>017699-16-0</b>  | <b>96/95/90</b>                 | <b>25,01</b>          | <b>0,33</b>    | <b>1097</b>          |
| terpinolelo                     | 000586-62-9         | 96 / 96                         | 26,22                 | 0,91           | 1088                 |
| <b>sabineno hidratado</b>       | <b>015826-82-1</b>  | <b>95/95/94</b>                 | <b>26,48</b>          | <b>0,31</b>    | <b>1068</b>          |
| terpineol - 4                   | 000562-74-3         | 97/96/95                        | 30,49                 | 0,77           | 1177                 |
| <b>alfa-copaeno</b>             | <b>003856-25-5</b>  | <b>99/98/98</b>                 | <b>47,06</b>          | <b>0,99</b>    | <b>1376</b>          |
| beta elemeno                    | 000515-13-9         | 95/94                           | 48,15                 | 0,5            | 1391                 |
| <b>trans-cariofileno</b>        | <b>000087-44-5</b>  | <b>99/99/99</b>                 | <b>51,78</b>          | <b>6,86</b>    | <b>1404</b>          |
| gamma elemeno                   | 003242-08-8         | 99                              | 51,98                 | 0,7            | 1433                 |
| <b>aromadendreno</b>            | <b>000489-39-4</b>  | <b>99/99/99</b>                 | <b>53,11</b>          | <b>0,75</b>    | <b>1439</b>          |
| alfa humuleno                   | 006753-98-6         | 93/93                           | 54,3                  | 3,51           | 1454                 |
| germacreno D                    | 023986-74-5         | 98/96/96                        | 55,93                 | 0,44           | 1480                 |
| beta selineno                   | 017066-67-0         | 99/99/99                        | 56,45                 | 0,68           | 1485                 |
| ledeno / viridifloreno          | 021747-46-6         | 86                              | 57,06                 | 2,86           | 1493                 |
| <b>delta cadineno</b>           | <b>000483-76-1</b>  | <b>98/98/98</b>                 | <b>58,76</b>          | <b>1,33</b>    | <b>1524</b>          |
| <b>espatulenol</b>              | <b>077171-55-2</b>  | <b>95/95</b>                    | <b>63,39</b>          | <b>1,45</b>    | <b>1576</b>          |
| <b>cariofileno óxido</b>        | <b>001139-30-6</b>  | <b>96/96/95</b>                 | <b>64,01</b>          | <b>0,84</b>    | <b>1581</b>          |
| <b>globulol</b>                 | <b>000489-41-8</b>  | <b>99/99/99</b>                 | <b>64,31</b>          | <b>0,64</b>    | <b>1583</b>          |
| Total(%)                        |                     |                                 |                       | 31,24          |                      |

**Tabela 27.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 06/06/00) utilizando rampa de aquecimento 02, conforme tabela 25.

| <b>Composto</b>           | <b>a<br/>C.A.S.</b> | <b>grau de<br/>similaridade</b> | <b>b<br/>TR (min)</b> | <b>c<br/>%</b> | <b>d<br/>IR Lit.</b> |
|---------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| alfa pineno               | 80-56-8             | 96/96/96                        | 9,62                  | 0,15           | 939                  |
| beta pineno               | 127-91-3            | 97/97/97                        | 11,12                 | 0,77           | 980                  |
| alfa felandreno           | 99-83-2             | 97/96/91                        | 11,9                  | 0,61           | 1005                 |
| para cimeno               | 99-87-6             | 95/95                           | 12,47                 | 0,40           | 1026                 |
| limoneno                  | 138-86-3            | 98/98/97                        | 12,88                 | 0,59           | 1031                 |
| <b>trans beta ocimeno</b> | <b>3779-61-1</b>    | <b>96/95</b>                    | <b>13,16</b>          | <b>0,45</b>    | <b>1040</b>          |
| tridecano                 | 629-50-5            | 97/96/95                        | 27,24                 | 0,16           | 1299                 |
| <b>alfa copaeno</b>       | <b>3856-25-5</b>    | <b>99/99/99</b>                 | <b>33,42</b>          | <b>0,20</b>    | <b>1376</b>          |
| beta elemeno              | 515-13-9            | 99/95                           | 34,04                 | 0,57           | 1391                 |
| alfa gurjuneno            | 489-40-7            | 95/95/94                        | 35,57                 | 0,16           | 1409                 |
| <b>trans cariofileno</b>  | <b>87-44-5</b>      | <b>99/99</b>                    | <b>36,42</b>          | <b>8,30</b>    | <b>1404</b>          |
| <b>aromadendreno</b>      | <b>489-39-4</b>     | <b>99/99/99</b>                 | <b>37,45</b>          | <b>2,10</b>    | <b>1439</b>          |
| alfa humuleno             | 6753-98-6           | 97/97/97                        | 38,6                  | 10,64          | 1454                 |
| alloaromadendren          | 25246-27-9          | 99/99                           | 38,91                 | 2,19           | 1461                 |
| alfa farneseno            | 26560-14-5          | 95/83/93                        | 40                    | 5,86           |                      |
| <b>delta cadineno</b>     | <b>39029-41-9</b>   | <b>99/99/97</b>                 | <b>42,41</b>          | <b>1,39</b>    | <b>1524</b>          |
| nerolidol                 | 7212-44-4           | 94/91                           | 45,13                 | 13,59          |                      |
| <b>espatulenol</b>        | <b>6750-60-3</b>    | <b>99/91</b>                    | <b>47,05</b>          | <b>1,83</b>    | <b>1576</b>          |
| <b>cariofileno oxido</b>  | <b>1139-30-6</b>    | <b>95/91/91</b>                 | <b>47,71</b>          | <b>2,13</b>    | <b>1581</b>          |
| <b>globulol</b>           | <b>489-41-8</b>     | <b>99/99/99</b>                 | <b>47,96</b>          | <b>1,22</b>    | <b>1583</b>          |
| torreiol                  | 19435-97-3          | 99                              | 52,77                 | 0,68           | 1645                 |
| fitol                     |                     | 87                              | 76,6                  | 0,56           | 1949                 |
| Total(%)                  |                     |                                 |                       | 54,55          |                      |

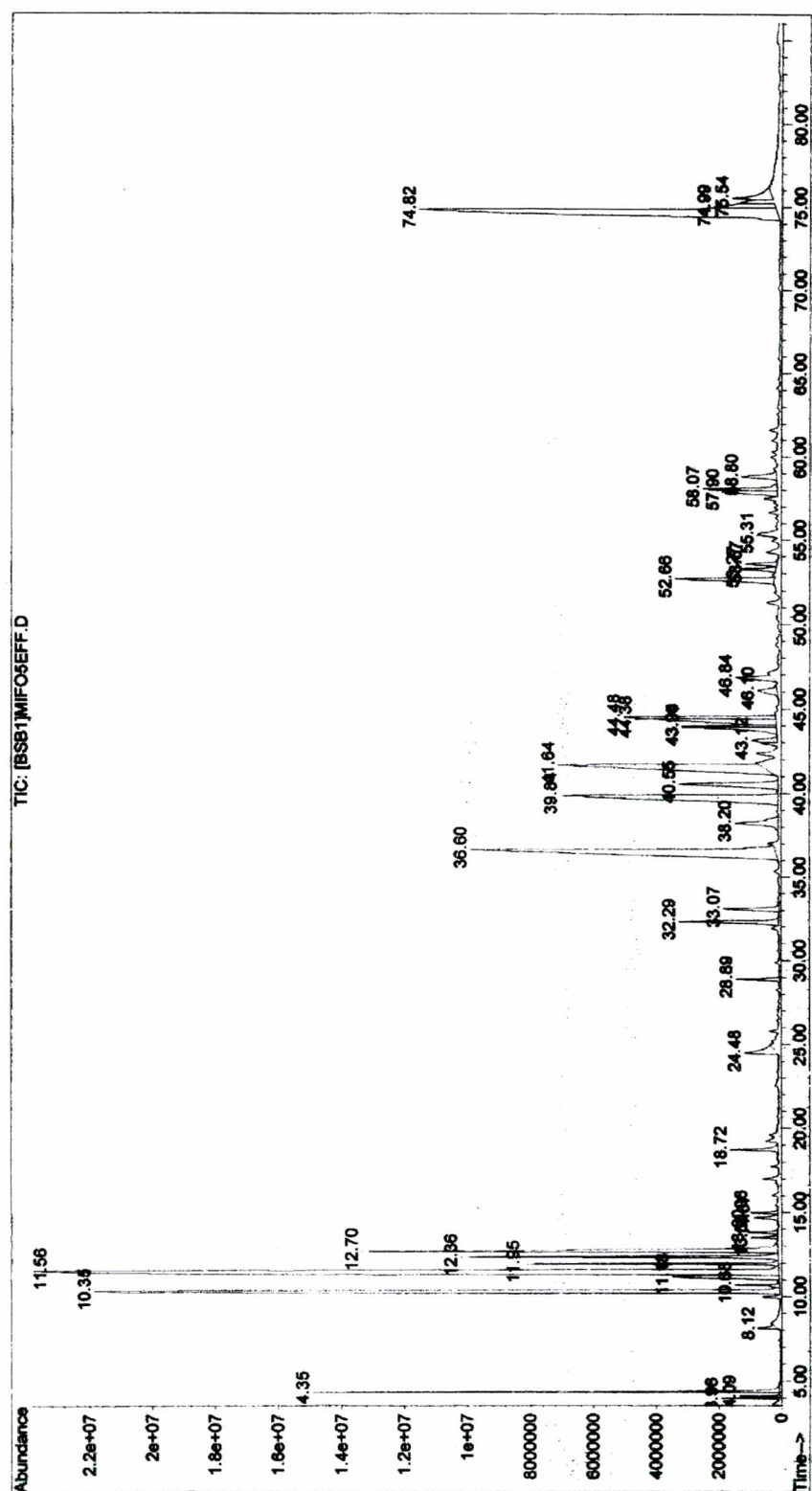
**Tabela 28.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta 09/12/00).

| Nome Composto             | <sup>a</sup> |                      | <sup>b</sup> | <sup>c</sup> | <sup>d</sup> |         | <sup>e</sup> |
|---------------------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|---------|--------------|
|                           | C.A.S.       | grau de similaridade |              |              | IR Lit.      | IR Obs. |              |
| alfa pineno*              | 80-56-8      | 96/96/95             | 10,36        | 10,72        | 939          | <       |              |
| canfeno                   | 79-92-5      | 97/97/97             | 10,68        | 0,34         | 953          | 953     |              |
| sabineno                  | 387-41-5     | 96/96/96             | 11,18        | 1,79         | 976          | 973     |              |
| beta pineno               | 127-91-3     | 96/95/94             | 11,57        | 18,11        | 980          | 989     |              |
| alfa felandreno           | 99-83-2      | 97/96/95             | 11,95        | 1,65         | 1005         | 1004    |              |
| para cimeno               | 99-87-6      | 94                   | 12,35        | 2,61         | 1026         | 1018    |              |
| limoneno*                 | 138-86-3     | 99/99/97             | 12,70        | 5,08         | 1031         | <       |              |
| gama terpineno            | 99-85-4      | 96/95/95             | 13,50        | 0,22         | 1062         | 1053    |              |
| cis sabineno hidratado    | 17699-16-0   |                      | 13,79        | 0,26         | 1068         | 1061    |              |
| alfa terpinoleno          | 586-62-9     | 96/94                | 14,67        | 0,29         | 1088         | 1084    |              |
| trans sabineno hidratado  | 17699-16-0   | 90                   | 14,96        | 0,26         | 1097         | 1091    |              |
| terpinen-4-ol             | 562-74-3     | 97/95                | 18,72        | 0,6          | 1177         | 1173    |              |
| safrol                    | 94-59-7      | 98/98/98             | 24,48        | 0,72         | 1285         | 1271    |              |
| alfa copaeno              | 3856-25-5    | 98/98/98             | 32,30        | 1,48         | 1376         | 1372    |              |
| beta elemeno              | 515-13-9     | 93/93                | 33,07        | 0,85         | 1391         | 1381    |              |
| trans cariofileno (beta)* | 87-44-5      | 99/99/99             | 36,60        | 10,01        | 1418         | <       |              |
| aromadendreno             | 489-39-4     | 99/99/98             | 38,20        | 1,17         | 1439         | 1439    |              |
| alfa humuleno             | 6753-98-6    | 97                   | 39,83        | 6,32         | 1454         | 1460    |              |
| alloaromadendren          | 25246-27-9   | 99/99                | 40,55        | 2,17         | 1461         | 1469    |              |
| beta selineno             | 17066-67-0   | 95/95/94             | 41,64        | 6,79         | 1485         | 1482    |              |
| E,E alfa farneseno*       | 502-61-4     | 91/91/91             | 43,93        | 0,30         | 1508         | <       |              |
| biciclogermacreno         | 24703-57-1   | 99/96                | 44,38        | 4,78         | 1494         | 1512    |              |
| gama cadineno             | 39029-41-9   | 62                   | 46,09        | 0,54         | 1513         | 1526    |              |
| delta cadineno            | 483-76-1     | 99/98/96             | 46,84        | 0,65         | 1524         | 1532    |              |
| espatulenol*              | 6750-60-3    | 93/86                | 52,66        | 1,8          | 1576         | <       |              |
| cariofileno oxido         | 1139-30-6    | 93/91/91             | 53,27        | 1,52         | 1581         | 1584    |              |
| globulol                  | 489-41-8     | 99/99/99             | 53,56        | 0,44         | 1583         | 1588    |              |
| tau muurolol              | 19912-62-0   | 58/55                | 57,90        | 0,99         |              | 1643    |              |
| torreiol / delta          | 19435-97-3   | 99/98                | 58,08        | 1,07         | 1645         | <       |              |
| alfa cadinol              | 481-34-5     | 94                   | 58,80        | 0,72         | 1653         |         |              |
| não identificado          |              |                      | 74,82        | 11,61        |              |         |              |
|                           |              |                      | Total (%)    | 95,86        |              |         |              |

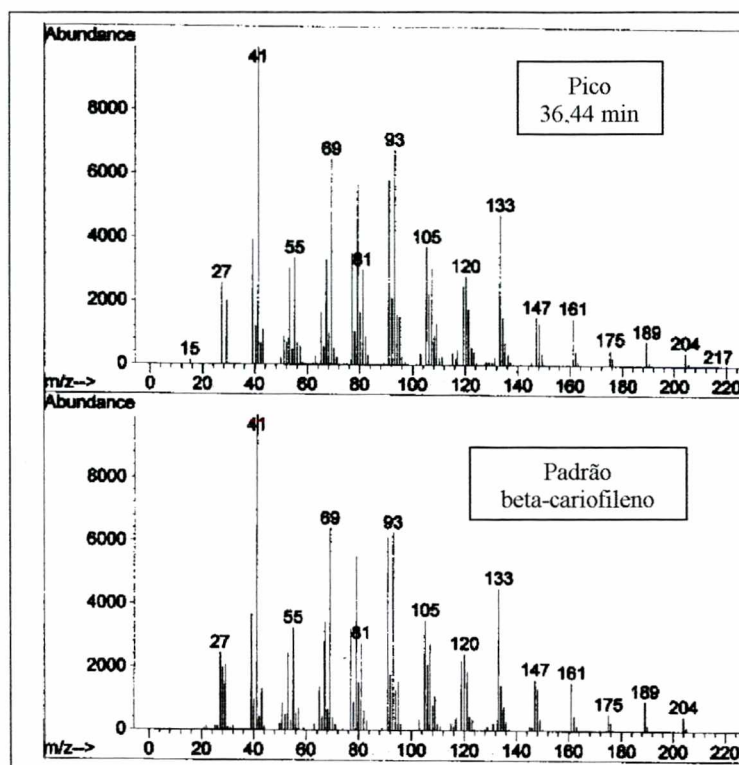
Programação rampa de aquecimento 04 – 80°C por 1 minuto, de 80°C - 140°C (12 °C/min) permanecendo por 10 minutos, de 140°C – 160°C (2° C/min) permanecendo por 20 minutos e de 160°C – 250°C (3°C/min) permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e injeção de 0,4 microlitros de óleo bruto; (\*) padrões utilizados; (a) C.A.S. – Chemical Abstract Standard; (b) TR – tempo de retenção; (c) % – concentração do constituinte; (d) IR Lit. – Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995); (e) IR Obs. - Índice de Retenção observado.

A figura 33 mostra o cromatograma de CG-EM do óleo essencial das folhas frescas da coleta de 09/12/00 da espécie *Piper mollicomum* Kunth. Os principais constituintes deste óleo identificado por CG-EM são: alfa-pineno (10,72%), beta-pineno (18,11%), beta-cariofileno (10,01%) e alfa-humuleno (6,32%) e os espectros comparativos com a biblioteca de dados do beta-cariofileno e alfa-humuleno constam nas figuras 34 e 35.

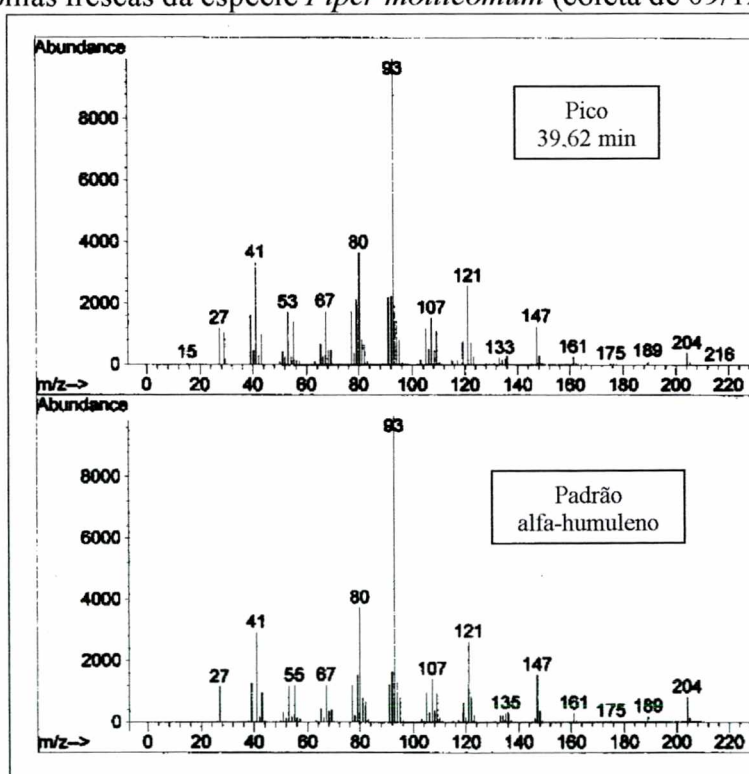




**Figura 33.** Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 09/12/00), rampa 04 e injeção de 0,2  $\mu$ L de amostra.



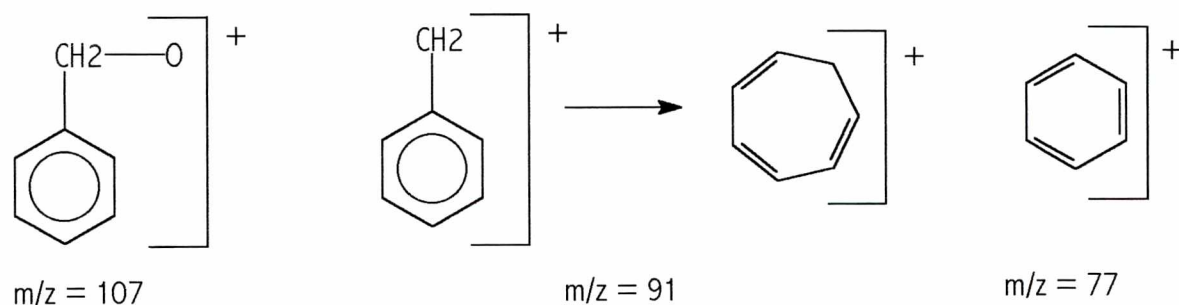
**Figura 34.** Espectro comparativo de massa do beta-cariofileno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 09/12/00).



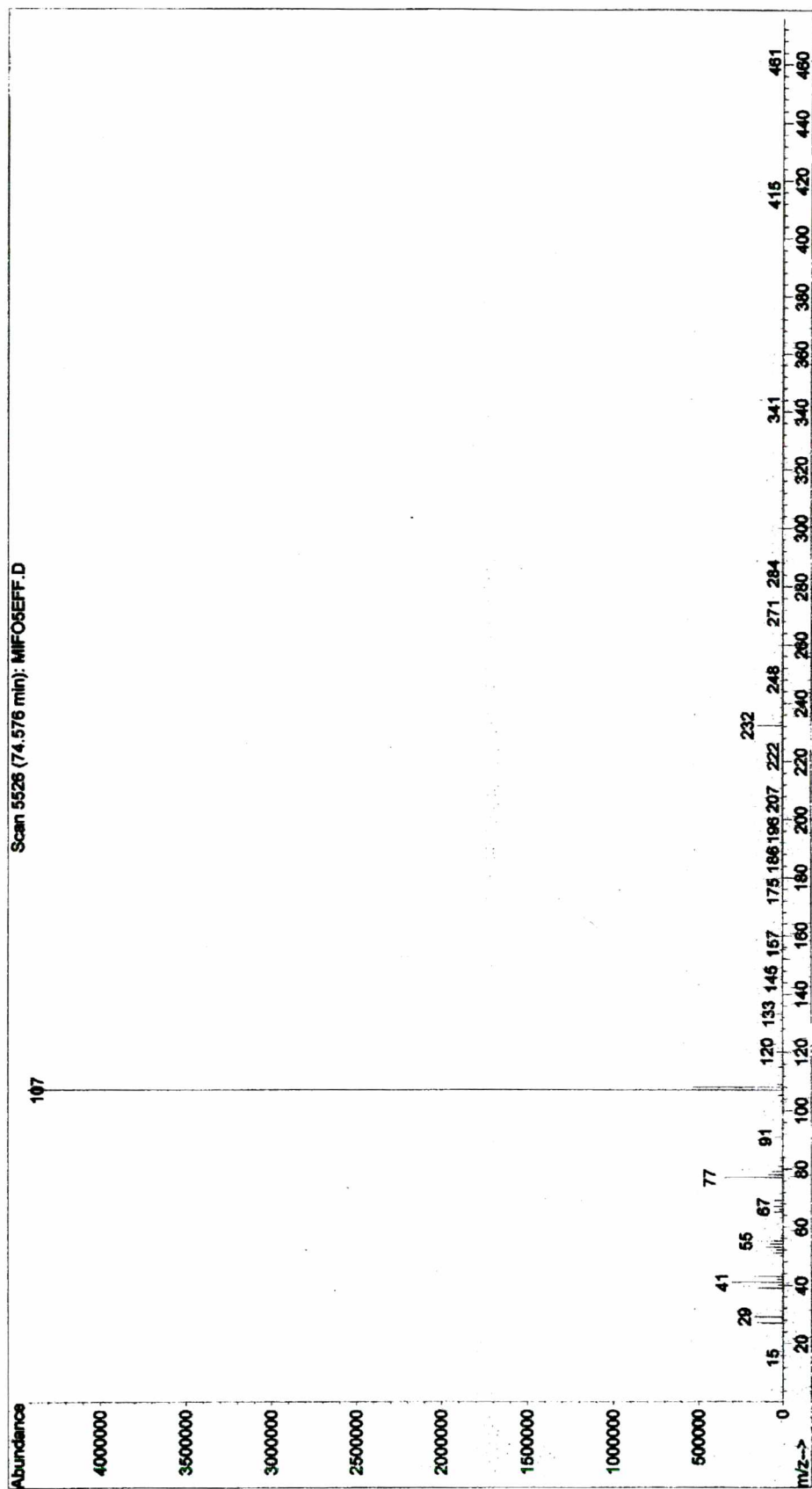
**Figura 35.** Espectro comparativo de massa do alfa-humuleno, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 09/12/00).

Um componente do óleo na tabela 28 com o tempo de retenção de 74,82 min., e 11,97% de concentração, não foi possível identificar mesmo com análise de CG-EM. O espectro de massa não permitiu estabelecer com segurança o íon molecular deste componente (figura 40), conseqüentemente, não foi possível determinar sua estrutura a partir desta análise em comparação com a literatura (ADAMS, 1995).

Analisando o espectro de massa do componente não identificado pode se observar que os fragmentos 107, 91 e 77 indicam a presença dos grupos benziloxi, benzílico que se rearranja a íon tropílico e ainda pode-se observar o grupo fenílico (figura 39). Os fragmentos 15, 29 e 41 indicam a presença de cadeia alifática.



**Figura 36.** Grupos benziloxi, benzílico que se rearranja a íon tropílico e o grupo fenílico.



**Figura 37.** Espectro de massa de componente não identificado, da análise do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper mollicomum* (coleta de 09/12/00).

### 5.6 *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum*

Observa-se, na tabela 29 o grau de desidratação das folhas da espécie *Piper gaudichaudianum*, sendo que estas variaram entre 70% e 74%.

**Tabela 29.** Grau de desidratação das folhas da *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum* após secagem a temperatura ambiente.

| Data     | Perda         |
|----------|---------------|
| Coleta   | Água (folhas) |
| 01/04/00 | 70,93%        |
| 13/05/00 | 74,42%        |
| 09/12/00 | 71,53%        |

Os resultados obtidos nas análises da espécie estão descritas na tabela 30, sendo que o teor de óleo essencial obteve pouca variação, onde as folhas frescas oscilaram de 0,07% a 0,09%, as folhas secas de 0,17% a 0,22% e os caules de 0,01% a 0,04%. Por possuírem baixa concentração de óleo essencial e ainda por não dispor de grande quantidade de planta, obtive-se poucos resultados com esta espécie.

As folhas apresentaram fluorescência nas cromatoplasmas reveladas em ultravioleta, diferentemente dos caules. Já as revelações das cromatoplasmas com iodo apresentaram manchas marrons em todas as amostras, indicando a presença de ligações duplas alternadas.

Não foi possível obter nenhum resultado de densidade pela escassez de óleo extraído. O índice de refração dos óleos variaram de 1,4900 a 1,5280.

As análises de massa dos óleos desta planta apresentaram baixa fidelidade, principalmente pelo fato de termos pouca amostra para análise, além da complexidade de sua composição. Os resultados da coleta de 01/04/00 constam na tabela 31 e na figura 38 temos o cromatograma de massa deste óleo.

Verifica-se que na constituição do óleo existe uma variedade de componentes, sendo que não há um em grande concentração. Dentre os componentes identificados, citamos



como principais: alfa humuleno (6%), beta e alfa selineno (5% cada), espatulenol (5%) e cariofileno óxido (6%).

**Tabela 30.** Resultados obtidos das extrações de óleo essencial de diferentes partes da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth, var. *gaudichaudianum*.

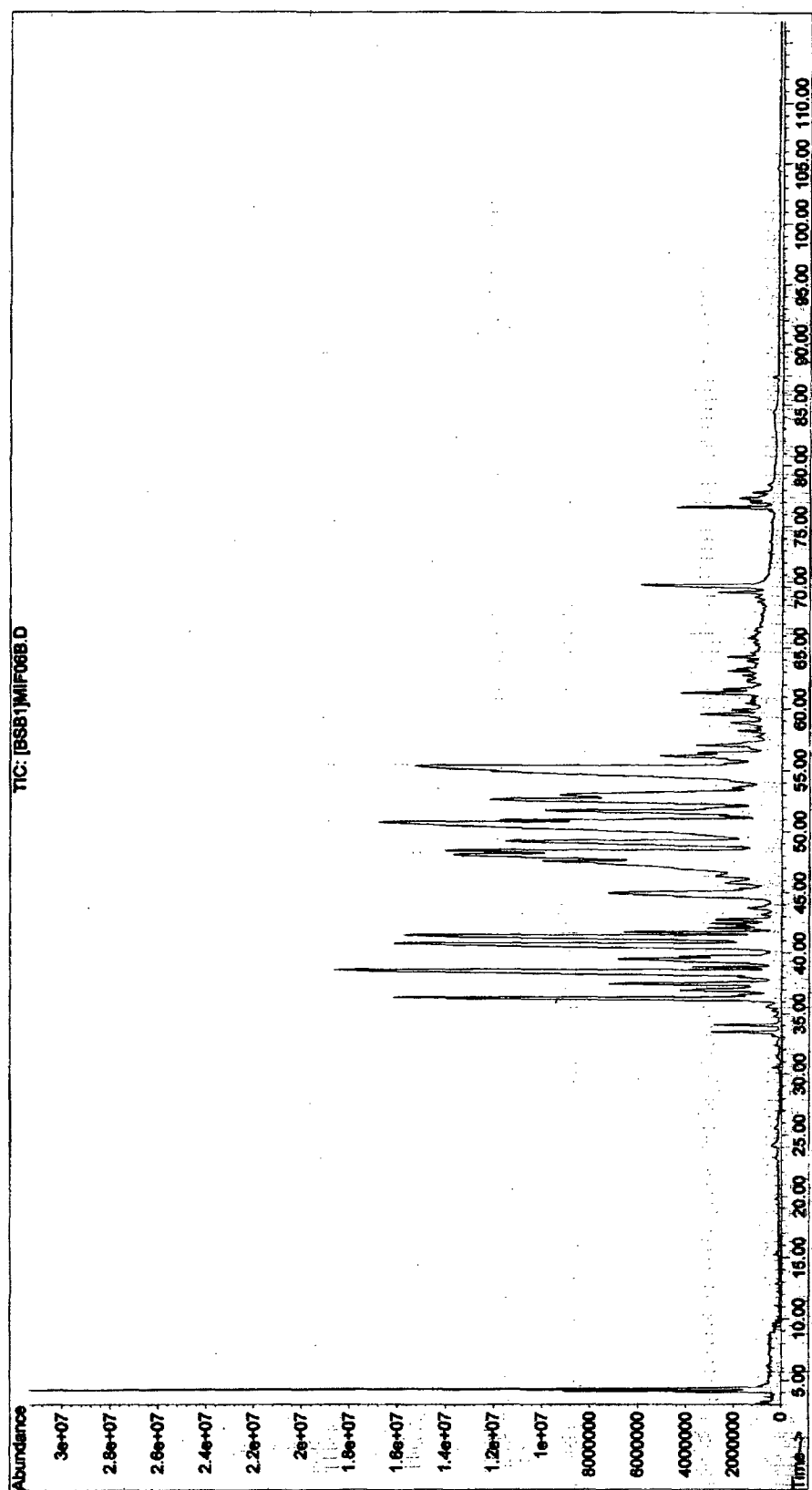
| Data Coleta | Parte Analisada | Rendimento Óleo | Fluorescência | Revelação Iodo | Índice Refração |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|
| 01/04/00    | folha fresca    | 0,07%           | presente      | presente       | 1,5000          |
|             | folha seca      | 0,22%           | presente      | presente       | 1,5037          |
|             | caule fresco    | 0,04%           | ausente       | presente       | 1,5280          |
| 13/05/00    | folha fresca    | 0,09%           | presente      | presente       | 1,4998          |
|             | folha seca      | 0,17%           | presente      | presente       | 1,4900          |
|             | caule fresco    | 0,01%           | ausente       | presente       | 1,5015          |
| 09/12/00    | folha fresca    | am. perdida     | presente      | presente       | <<<             |

**Tabela 31.** Constituição química do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth (coleta de 01/04/00).

| Composto                 | <sup>a</sup> C.A.S. | grau de similaridade | <sup>b</sup> TR (min) | <sup>c</sup> % | <sup>d</sup> IR Lit. |
|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| alfa copaeno             | 3856-25-5           | 99/99/99             | 33,43                 | 0,38           | 1376                 |
| beta elemeno             | 515-13-9            | 97/96                | 34,04                 | 0,36           | 1391                 |
| alfa gurguneno           | 489-40-7            | 99/99/99             | 35,57                 | 0,11           | 1409                 |
| trans (beta) cariofileno | 87-44-5             | 99/99/99             | 36,33                 | 3,47           | 1418                 |
| aromadendreno            | 489-39-4            | 99/99/99             | 37                    | 1,90           | 1439                 |
| alfa humuleno            | 6753-98-6           | 97/97/96             | 38,59                 | 6,27           | 1454                 |
| beta selineno            | 17066-67-0          | 99/99/99             | 40,75                 | 5,19           | 1485                 |
| alfa selineno            | 473-13-2            | 99/99/98             | 41,4                  | 5,09           | 1494                 |
| calameneno               | 483-77-2            | 98/97/97             | 42,24                 | 0,21           | 1521                 |
| cadineno                 | 483-76-1            | 99/99/98             | 42,42                 | 0,34           | 1524                 |
| alfa calacoreno          | 21391-99-1          | 97/59                | 43,71                 | 0,21           | 1542                 |
| espatulenol              | 6750-60-3           | 98/95/89             | 47,54                 | 5,41           | 1576                 |
| cariofileno óxido        | 1139-30-6           | 98/98/96             | 48,06                 | 5,84           | 1581                 |
| globulol                 | 489-41-8            | 98/98/95             | 48,4                  | 3,21           | 1583                 |
| viridiflorol             | 552-02-3            | 95                   | 54,88                 | 4,53           | 1590                 |
| vulgarol B               | 11056-03-4          | 91                   | 57,00                 | 0,71           | 1647                 |
| fitol                    | 150-86-7            | 97/97/95             | 76,57                 | 0,54           | 1949                 |
| Total(%)                 |                     |                      |                       | 43,77          |                      |

Programação rampa de aquecimento 02 -120° C por 10 minutos, de 120° C - 150° C (4° C/min), de 150° C - 180° C (4° C/min), de 180° C - 250° C (6° C/min), permanecendo nesta temperatura por 5 minutos e injeção de 0,2 microlitros de óleo bruto;; (a) C.A.S. - Chemical Abstract Standard; (b) TR - tempo de retenção; (c) % - concentração do constituinte; (d) IR Lit. - Índice de Retenção encontrado na literatura (ADAMS, 1995).





**Figura 38.** Cromatograma realizado nas folhas frescas da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth (coleta de 13/05/00), rampa 02 e injeção de 0,2  $\mu$ L de amostra.

## 5.7 Ensaios Microbiológicos

Inicialmente, a proposta foi a de trabalhar com todas as espécies e todas as coletas de cada espécie mencionadas nesta dissertação mas, pela impossibilidade de se obter quantidade suficiente de amostra de óleo para a realização dos testes microbiológicos, foram realizados testes microbiológicos somente com algumas coletas de quatro espécies: *Piper regnellii* (Miq) C.DC., *Piper regnellii* var. *pallenscens* (C.DC) Yuncker, *Piper callosum*, *Piper mollicomum* Kunth,

A razão para a escolha das cepas baseia-se no fato de que, tivemos como objetivo abranger o máximo de grupos microbiológicos. Assim, a *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo não esporulado, o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria (cocos) gram positiva e a *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo piocianico gram negativo, não esporulado e bastante aeróbio.

Na tabela 32 apresenta-se o resultado obtido nos ensaios microbianos das espécies já mencionadas.

**Tabela 32.** Espécies e resultados obtidos dos ensaios microbiológicos realizados utilizando as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

| Espécie<br>Piperaceae                          | Data<br>Coleta | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|--|----------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C.DC              | 07/06/00       | 0                       | 0                            | 0                             |
| <i>Piper regnellii</i> (Miq) C.DC              | 07/12/00       | 0                       | 0                            | 0                             |
| <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallenscens</i> | 12/12/00       | 0                       | 0                            | 0                             |
| <i>Piper callosum</i>                          | 20/03/00       | 0                       | 12 mm                        | 0                             |
| <i>Piper callosum</i>                          | 12/12/00       | 0                       | 0                            | 0                             |
| <i>Piper mollicomum</i>                        | 01/04/00       | 20 mm                   | 21 mm                        | 0                             |
| <i>Piper mollicomum</i>                        | 06/06/00       | 0                       | 12 mm                        | 0                             |
| <i>Piper mollicomum</i>                        | 09/12/00       | 0                       | 10 mm                        | 0                             |

Nenhuma das espécies testadas apresentou halo de inibição em relação a *Pseudomonas aeruginosa*. Já em relação a *Escherichia coli*, a espécie *Piper mollicomum*

(coleta de 01/04/2000) induziu a formação de halo de inibição de 20 mm, sendo muito ativo para este microorganismo (ABREU, 2001A).

Para a cepa de *Staphylococcus aureus*, a espécie *Piper callosum* (coleta de 20/03/2000) apresentou-se parcialmente ativo, com halo de 12 mm e a *Piper mollicomum*, coleta de 01/04/2000 apresentou-se muito ativo, com 21 mm de halo de inibição e as coletas de 06/06/2000 e 09/12/2000 apresentaram parcialmente ativas, com halo de 12 e 10 mm, respectivamente.

As espécies *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. e *Piper regnellii* var. *pallescens* não apresentaram inibição para nenhuma das cepas estudadas.

Fazendo uma associação do perfil químico dos óleos essenciais da *Piper mollicomum*, verificamos que nos óleos coletados em 01/04/00, 06/06/00 e 09/12/00 possuem, de modo geral, os mesmos constituintes, mas diferem bastante na concentração de cada um deles. Assim, temos como principais constituintes da coleta de 01/04/00, o alfa-pineno (10%), beta-pineno (23%), limoneno (8%) e trans-cariofileno (7%), na coleta de 06/06/00: trans-cariofileno (8%), alfa-humuleno (11%), beta-farneseno (6%), nerolidol (14%). E na coleta de 09/12/00: alfa pineno (11%), beta pineno (18%), limoneno (5%), trans-cariofileno (10%), alfa humuleno (6%), biciclogermacreno (5%). Este pode ser a razão para os diferentes resultados de atividade antimicrobiana encontrado para *Escherichia coli*.

Além desta variação dos teores dos componentes dos óleos, que pode ser justificado pelas diferentes épocas de coletas, temos também a existência de um componente não identificado que variou as concentrações, onde na coleta de 01/04/00 não foi identificado, na coleta de 06/06/00 encontramos 22% e na coleta de 09/12/00, 12%.

## 6 CONCLUSÃO

Verificou-se a existência de grande variedade de espécies de Piperáceas no Vale do Itajaí, bem como uma diversidade de perfis químicos dos seus óleos essenciais, tanto em espécies diferentes, como também numa mesma espécie, quando coletada em condição sazonal, alteração climática e localização geográfica distintas.

A utilização do índice de Retenção no auxílio da identificação de compostos em CG-EM foi bastante interessante para a confirmação dos constituintes dos óleos essenciais.

A partir de resultados obtidos com cada espécie estudada, podemos concluir que:

- 1- A espécie *Piper caldense* C.DC. não apresentou quantidade significativa de óleo;
- 2- Na *Piper callosum* obteve-se 0,70% de óleo essencial, com 60% de safrol;
- 3- A *Piper lindbergii* C.DC. in DC. possui 0,30% de óleo essencial, sendo óxido de cariofileno (19%) o principal constituinte determinado;
- 4- A espécie *Piper Regnellii* var. *pallescens* (C.DC.) Yuncker obteve 0,50% de óleo essencial, com 18% de dilapiol e 54% apiol;
- 5- *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. in DC, var. *regnellii* possui 0,40% de óleo, com constituintes variados, sendo eles beta-pineno (20%), biciclogermacreno (8%) e espatulenol (9%);
- 6- Na *Piper mollicomum* Kunth com 0,15% de óleo, encontrou-se entre os principais constituintes o alfa-pineno (10%), beta-pineno (18%) e trans-cariofileno (10%);
- 7- *Piper gaudichaudiamum* Kunth, var. *gaudichaudiamum* obteve-se 0,10% de óleo, alfa-humuleno (6%), alfa-selineno (5%), beta-selineno (5%), espatulenol (5%) e óxido de cariofileno (6%);

Os resultados obtidos com os testes microbiológicos confirmaram a existência de atividade medicinal deste gênero, neste caso evidenciado pela espécie *Piper mollicomum* que apresentou muita atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e ainda parcial atividade nas espécies *Piper callosum* e *Piper mollicomum* para *Staphylococcus aureus* (LOBATO, et al, 1989; CONSTANTIN, 2001).

Enfim, conclui-se que existe uma infinidade de pesquisas que podem ser realizadas, sempre proporcionando harmonia entre a natureza e a humanidade.



## 7 PERSPECTIVAS

Pesquisar produtos naturais abre espaço para uma variedade de linhas de pesquisa, principalmente se nos referimos à espécie nativas pouco estudadas e numa região tão rica e biodiversa como a nossa Mata Atlântica.

Em se tratando especificamente desta dissertação, pode-se citar como fonte de novas pesquisas, o isolamento do apiol e dilapiol e, é claro, seu estudo como precursor na síntese orgânica de novas rotas e até de novas substâncias.

Outro ponto importante seria o estudo agrônômico das alterações de fatores extrínsecos à planta que fazem com que estas alterem sua composição, principalmente de óleo essencial, além de propiciar o cultivo agroecológico destas espécies, visando um novo mercado de trabalho e uma nova fonte de renda para agricultores da região, principalmente, sem comprometer a harmonia da natureza.

Estudar outros metabólitos secundários encontrados nas espécies de piperáceas, como ligninas, flavonóides podem ser nova proposta de pesquisa.

Em relação aos estudos microbiológicos, podemos estudar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais, além de suas atividades antifúngicas e antiinflamatórias.

Estas são apenas algumas perspectivas de pesquisa. A Ciência está sempre em busca de descobertas que levem ao entendimento e aproveitamento dos recursos do Universo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABREU, A.M. de; AGUIAR, E.M. de; CALDERARI, M.T.; BRIGHENTE, I.M.C.; REBELO, R.A. *Piperaceae from Santa Catarina, Brazil – Searching for Essencial Oils. Abstract Publication of 22<sup>nd</sup> IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products*. São Carlos, PPA-162, 2000.
- 2 ABREU, A.M. de; BRIGHENTE, I.M.C.; CALDERARI, M.T.; REBELO, R.A.; VIEIRA, G.R.T.. *Chemical Composition and Antibacterial Activity Related to the Essential Oil of the Piper mollicomum Kunth*. **Anais do 32<sup>nd</sup> International Symposium on Essential Oils**. Wroclaw, Poland, P-85, 2001A.
- 3 ABREU, A.M. de; SEVEGNANI, L.; MACHICADO, A.R.; ZIMERMANN, D.; REBELO, R.A.. *Piper mikanianum (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil – A New Source of Safrole*. Artigo submetido para publicação **Planta Medica**, 2001B.
- 4 ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.
- 5 AGUIAR, E.M. de; CALDERARI, M.T.; BRIGHENTE, I.M.C.; REBELO, R.A. *Isolamento e caracterização de óleos essenciais de Piperáceas com Estado de Santa Catarina*. **Anais do VII Encontro de Química da Região Sul**. Tubarão, QO-20, 1999.
- 6 ALVES, M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.. **Biological screening of brazilian medicinal plants**. Mem Inst. Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- 7 ANDRADE, E.H.A.; ZOLGHBI, M. das G.B.; SANTOS, A.S.. *Essential Oils of Piper gaudichaudianum Kunth and P. regnellii (Miq.) C.DC.*. **J. Essent. Oil. Res.**, 10:465-467, 1998.
- 8 ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos – Teórica e Prática**. Viçosa: Ed. U.F.V., 2 ed., p. 127-135, 215, 1999.
- 9 ATAL, C.K.; DHAR, K.L.; SINCH, J.. The Chemistry of Indian *Piper* species. **Lloydia**, 38(3): 257-65, 1975.
- 10 BAUER, K.; GARBE, D. **Common Fragrances and Flavor Materials: preparation, properties and uses**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, p. 113-115, 149-150, 1985.

- 11 BENEVIDES, P.J.C., SARTORELLI, P., KATO, M.J.; *Phenylpropanoids and neolignans from Piper regnellii*. **Phytochemistry** 52: 339-343, 1999.
- 12 BORDIGNON, S.A.A. de L.; SCHENKEL, E.P.; SPITZER, V. *The essential oil of Cunila platyphylla Epling (Lamiaceae)*. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. V.17, p.143-6, 1998.
- 13 BORDIGNON, S.A.A. de L.; SCHENKEL, E.P.; SPITZER, V. *The essential oil composition of Cunila microcephala and Cunila fasciculata*. **Phytochemistry**, v.44, p. 1283-86, 1997.
- 14 BORDIGNON, S.A.A. de L.; SCHENKEL, E.P.; SPITZER, V. *The essential oil of Cunila incisa (Lamiaceae) – A Rich Source of 1,8-cineole*. **Química Nova**, v.19, p. 105-7, 1996.
- 15 BREITMAIER, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner, 1999.
- 16 BRYANT, J. J.. *Perf & Ess. Oil Record*. 15: 1-426, 1924.
- 17 CALDERARI, M.T. *Extrato de Plantas Medicinais + Alimentos = Alimentos Nutracêuticos*. **Jornal Duas Rodas Acontece**. Ano I, n.02, mai/jun, 2000.
- 18 CECHINEL FILHO, V. *Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no Niquar/Univali*. **Química Nova**. V. 23, n. 5, p.680-5, 2000.
- 19 CHEN, S.J.; WU, J.L.YEH; LO, Y.C.; CHEN, I.S.; CHEN, I.J. *C-fiber-evoked autonomic cardiovascular effects after injection of Piper betle inflorescence extracts*. **Journal of Ethnopharmacology**. 45, p.183-8, 1995.
- 20 CHILTON; PERRY. **Manual de Engenharia Química**. 5ª Ed.; Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1973.
- 21 CHOFRA, C. L.; BHATIA, M.C.; CHOFRA, I.C.. *In vitro antibacterial activity of oils from Indian Medicinal Plants*. **J. Am. Pharm. Assoc.** 49: 1-780, 1960.
- 22 CLEVINGER, J.F. *Apparatus for the determination of volatile oil*. **J. Am. Pharm. Ass.** Washington. v.17, p.315, 1928.
- 23 COCKING, T.T.; MIDDLETON, G. *Na improved method for the estimation of the essential oil content of drugs*. **J. Pharm. Pharmacol.** London, v.5, p.521, 1932.
- 24 CONSTANTIN, M.B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; FERREIRA, M.J.P.; STEPPE, M.; OHARA, M.T.; EMERENCIANO, V.P.; KATO, M.J.;

*Essential oils from Piper cernuum and Piper regnellii – Antimicrobial activities and Analysis by GC/MS and <sup>13</sup>C MNR.* Artigo submetido para publicação **Planta Medica**, 2001.

- 25 CORRÊA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v.4, 367-9, v.5, 373-4, 1926-1978.
- 26 CORRÊA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v.3, p.499-501, 1985.
- 27 CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J. de A.; ALENCAR, J.W. de; MACHADO, M.L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste.** Fortaleza: Edições UFC, p. 95-6, 1981.
- 28 CRAVEIRO, A.A.; QUEIROZ, D.C. de. *Óleos essenciais e Química Fina.* **Química Nova.** Sociedade Brasileira de Química, São Paulo: 16(3), p.224-8, 1993.
- 29 CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** New York: Columbia University, 1981.
- 30 DAVIS, P. **Aromaterapia.** São Paulo: Ed. Martins Fontes, 1996.
- 31 DYCHE-TEAGUE, F.C.. *Perf & Ess.* **Oil Record.** 15: 1-6, 1924.
- 32 FAKIM, A.G. *Constituents of the Essential Oils from Piper sylvestre Growing in Mauritius.* **Planta Medica.** V.60, p.376-377, 1994.
- 33 FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, São Paulo: Gráfica Siqueira, 2 ed., p.937-940, 1959.
- 34 FARNSWORTH, N.R. *Biological and phytochemical screening of plants.* **J. Pharm. Sci.** 55:1-225, 1966.
- 35 FORMACEK, V.; KUBECZKA, K.H. **Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy.** Chichester: John Wiley, 1982.
- 36 FREITAS, F. de A.S. de; **Informações gerais sobre a Pimenta Longa.** Embrapa, Rio Branco, 1995.

- 37 GEMBALLA, G. "*Ocotea pretiosa* M e Z" (Essência de sassafrás brasileiro). Rio de Janeiro, 1955. Tese (Doutorado: Farmácia e Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 38 GOTTLIEB, O.R. *et al.* **Óleos Essenciais da Amazônia VII**. Amazônia: Acta Amazônia, 11(1), p.143, 1981.
- 39 GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R. de M.B. **Biodiversidade, um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996.
- 40 GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. *Modified Distillation Trap*. **Chemist Analyst**. v.49, p. 114, 1960.
- 41 GUENTHER, E.; **The essential oils**. New York. pg. 752 v. IV, 1950.
- 42 GUSMANN, A.B.; MUCILLO, G.; PIRES, M.H. *Efeito do citrônolol sobre a germinação e desenvolvimento do amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.)*. **Semina**. v.11, n.1, p.20-24, 1990.
- 43 HARBORNE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 3.ed. London: Academic, 1988.
- 44 HARBONE, J.B. **Ecological biochemistry**. 4.ed. London: Academic, 1993.
- 45 HEGNAUER, R. **Verbreitung ätherischer Öle im Pflanzereich**. In: KUBECZA, K.H. (ed.) *Vorkommen und Analytik ätherischen Öle*. Stuttgart: Thieme, 1979.
- 46 HEWLETT & PACKARD, **Chemical Analysis Columns and Supplies**, p. 164-8, 1996.
- 47 IAPAR - INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Cultivo de Plantas Medicinais**. Londrina, p.51, 79-100 1995.
- 48 JAIN, S.R.; KAR, A. *The antibacterial activity of some essential oils and their combinations*. **Planta Medica**, 20: 1-118, 1972.
- 49 KESLEY, R.G.; REYNOLDS, G.W.; RODRIGUEZ, E. **The Chemistry of Biologically Active Constituents Secreted and Stored in Plant Trichomes**. New York: Plenum, 1984.
- 50 LINSKENS, H.H.; ALLEN, M.S. **Modern Methods of Plant Analysis**. In: LINSKENS, H.F. (Ed.) *Plant volatile analysis*. Berlin: Springer, v.19, 266S, 1997.



- 51 LOBATO, A.M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. de F. da S.; MAIA, J. G. S.. *Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais da Amazônia. Acta Amazônica*. 19: 355-363, 1989.
- 52 MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L. da; LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M. das G. B. ; RAMOS, L.S.. *Espécies de Piper da Amazônia ricas em Safrol. Química Nova*. 10(3): 200-4, 1987.
- 53 MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2. Ed. Oxford: Clarendon, 1987.
- 54 MARTINS, R.C.C.; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J.; *Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from Piper solmsianum. Phytochemistry*. 0: 1-4, 2000.
- 55 MARUZZELLA, J. C.; HENRY, P. A. *The in vitro antibacterial activity of essential oils and oil combination. J. Am. Pharm. Assoc.* 47: 1-294, 1958.
- 56 MARUZZELLA, J. C. *Perf & Ess. Oil Record*. 54: 1-823, 1963.
- 57 MATOS, F.J.A.; WASICKY, R.O., *Um melhoramento no aparelho para determinação dos óleos essenciais da Farmacopéia Brasileira Edição II (1959). Trib. Farm., Curitiba*, 28 (6), 1960.
- 58 MEYER, V. **Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie**. Frankfurt: Diesterweg, Sauerländer, 1979.
- 59 MIGUEL, O.G. **Estudo Químico e Farmacológico das Espécies *Plyllanthus sellowianus*, *Plyllanthus fraternus* e *Siphocampylus verticillatus***. Florianópolis, 1996. Tese (Doutorado: Química). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 60 MOREIRA, D.de L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F.; *Essential Oil Analysis of Piper Species (Piperaceae). An. Acad. Bras. Ci.* 70(4): 751-754, 1998.
- 61 MORITZ, O. *Die niederen Terpen: atherische ole and Harze allgemein*. In: PAECH, S.K. & TRACEY, M.V. **Modernemethoden der Pflanzenanalyse**. Berlin: Springer, v.3, 1955.
- 62 PENFOLD, A.; GRAND, S. *Perf & Ess. Oil Record*. 14:175, 437; 15: 127,388; 16: 14; 17: 251; 18: 100, 1923.
- 63 POSER, G.L. von; RÖRIG, L.R.; HENRIQUES, A.T.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BERRIERÈ, J.M.; *Aromatic Plants from Brazil. III. The Chemical Composition of Piper*

- gaudichaudiamun* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel Essential Oils. **J. Essent. Oil Res.**, 6: 337-340, 1994.
- 64 RAO, B. G. V.; NIGAM, S. S. *The in vitro antimicrobial efficiency of some essential oils.* **Flavour & Industry**. 1: 1-725, 1970.
- 65 REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário “Barbosa Rodrigues”, p.22-5, 1978.
- 66 REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Sellowia**. Herbário “Rodrigues”, Itajaí: 32, 1984.
- 67 RICE, E.L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984.
- 68 RIZZINI, C.T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil – Manual de Dendrologia Brasileira**. Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1971.
- 69 RIZZINI, C.T.; MORS, W.B.; **Botânica Econômica Brasileira; E.P.V.**, EDUSP, São Paulo, pg. 119, 1976.
- 70 ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- 71 RORIG, L.R.; POSER, G.L. von, *Investigação Fitoquímica em espécies de Piperaceae*. **Rev. Bras. Farm.**, 72(1): 15-17, 1991.
- 72 SALGUEIRO, L.; MARTINS, A.P.; VILA, R.; TOMI, F.; CAÑIGUERL, S.; CASANOVA, A.P. da C.; ADZET, T. *Essential oils from four Piper species*. **Phytochemistry**, 49(7): 2019-2023, 1998.
- 73 SCHLENKER, H. F. **Graciosa**: Programa de comunicação e manejo ecoturístico, Curitiba: Kingraf Ltda, 1996.
- 74 SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C. de; HENRIQUES, M. das G. M.O.; RAMOS, M.F.de S. *Óleos Essenciais – Potencial anti-inflamatório*. **Biotechnologia**. Brasília: KL3 Comunicação, ano III, p.38-43, 2000.
- 75 SILVA, M.; BITTNER, M.; HOENÜSEN, M.; BECERRA, J.; CAMPOS, V.; GONZALEZ, F.; CESPEDES, C. ; MARAMBIO, O. **Química de los triterpenos**. Washington, D.C.: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, p. 327-331, 1992.

- 76 SILVA, M. L. da; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, J. C.; PEDREIRA, G.; MARX, M. C.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. *Óleos essenciais da Amazônia VI. Acta Amazônica*. V.1, p. 41-2, 1971.
- 77 SILVA, R.A.D. da. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. Companhia Editora Nacional, São Paulo, p. 326, 321, 332, 577, 730, 805-6, 1929.
- 78 SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed. da UFSC, cap. 16 e 18, 1999.
- 79 SMANIA, A.J., DELLE MONACHE, F., SMANIA, E.F. **Antibacterialactivity of a substance produced by the fungus pycnoporus sanguineus. Journal of Ethnopharmacology**. 45, p. 177-181, 1995.
- 80 STAHL, E. **Dünnschicht-chromatographie**. Berlin: Springer, 1969.
- 81 STASI, L.C. di; **Triagem Farmacológica de Plantas Medicinais com Atividade Analgésica**. M.Sc. *thesis*, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1987.
- 82 TEIXEIRA, I.S.; PASSOLD, V.T. **Biocompatibilidade e Caracterização Química dos Óleos Essenciais de Laranja e Eucalipto, utilizados no Retratamento Endodôntico**. Itajaí, 1999. Monografia (Graduação: Cirurgião Dentista). Universidade do Vale do Itajaí.
- 83 TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de Fitoterapia**. 3 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, p.254-5, 1995.
- 84 THE MERCK INDEX. 12 ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 1996.
- 85 TYRREL, M.H., *Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies*. **Fd. Tech.** January, 68-72, 1990.
- 86 WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie 2, Drogen und ihre Inhaltsstoffe**. 5 ed. New York: G. Fischer, 1993.
- 87 WASICKY, R.O., *Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais*. **Rev. Fac. Farm. Bioquim.** São Paulo, I (I): jan/jun, 1963.
- 88 WASICKY, R.O.; AKISUE, G. *Um aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais*. **Rev. Fac. Farm. Bioquim.** São Paulo, 7 (2): jul/dez, 1969.

- 89 WINK, M. **Physiology of Secondary Product Formation in Plants.** In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed.). *Secondary products from plant tissue culture.* Oxford: Clarendon, 1990.
- 90 WORWOOD, S. **Aromaterapia – Um guia de A a Z para o uso terapêutico dos Óleos Essenciais.** São Paulo: Editora Best Seller, 1995.
- 91 YUNCKER, T.G. The *Piperaceae* of Brazil. **Hoehnea.** São Paulo: Instituto de botânica da USP, 2, p. 19-366, 1972.
- 92 YUNCKER, T.G. The *Piperaceae* of Brazil. **Hoehnea.** São Paulo: Instituto de botânica da USP, 3, p. 31-284, 1973.
- 93 ZAMBONI, S. Óleos Essenciais. **Revista Brasileira de Química.** São Paulo: XCV, 575(11), p.106-9, 1983.
- 94 ZIMERMANN, D. **Fontes alternativas de Safrol – estudo de Piperaceae do gênero *Piper* de ocorrência em Santa Catarina.** Blumenau, 1999. Monografia – Universidade Regional de Blumenau.